

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie du développement-oncogénèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Roland Abi Nahed**

Thèse dirigée par **Sylviane Hennebicq**

Préparée au sein de l'**Institut Albert Bonniot, INSERM U823, équipe « Génétique, Epigénétique et Thérapies de l'infertilité » Université Grenoble Alpes.**

Dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

## **Les phospholipases A2 au cours de la fécondation et du développement embryonnaire préimplantatoire : mécanismes moléculaires d'action et développement thérapeutique.**

Thèse soutenue publiquement le **24 juin 2015** devant le jury composé de :

**M Stephan NONCHEV**

PU institut Albert Bonniot, université Joseph Fourier Grenoble (Président),

**Mme Aminata TOURE**

DR CNRS, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Paris (Rapporteur),

**M Jean PARINAUD**

PU-PH, Médecine de la reproduction Pôle Femme Mère Couple, Hôpital Paule de Viguier, Toulouse (Rapporteur),

**M Gérard LAMBEAU**

DR CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice-Sophia Antipolis (Examineur),

**M Christophe ARNOULT**

DR CNRS, institut Albert Bonniot, l'université Joseph Fourier Grenoble (Examineur)

**Mme Sylviane HENNEBICQ**

PU-PH, institut Albert Bonniot, l'université Joseph Fourier Grenoble (Examineur)





## *Avant-propos*

L'heure est venue pour remercier les personnes qui ont œuvré à la concrétisation de mon travail.

Je remercie tous les membres du jury pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, Dr. Aminata TOURE et Pr. Jean PARINAUD, pour avoir accepté la charge de rapporteurs. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance pour avoir pris une partie de leur temps pour lire cette thèse, Pr. Stefan NONCHEV pour m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury, Dr. Gérard LAMBEAU, pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, pour sa sympathie et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux. Mes sincères remerciements pour votre lecture, votre présence aujourd'hui et les remarques qui viendront enrichir ce travail que j'aurai plaisir à partager et discuter avec vous.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au laboratoire GETI du département de Biologie de la faculté des sciences de l'Université de Grenoble I, sous la direction du Professeur Sylviane Hennebicq, ma plus grande gratitude, pour la confiance qu'elle m'a accordée. J'ai profité pendant longtemps du savoir et du savoir-faire dont j'ai pu bénéficier au cours de nombreuses discussions. J'aimerais aussi la remercier pour l'autonomie qu'elle m'a accordée, et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier, particulièrement, Dr. Christophe ARNOULT, le directeur de recherche, le chef du projet et le responsable du laboratoire pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je le remercie surtout pour son soutien, ses conseils, ses explications, la confiance qu'il m'a accordé et pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt que j'ai vécu durant ma thèse pour la qualité de son encadrement tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Le fil conducteur de ces 3 années fut bien sûr Christophe. Que de qualités dans mon encadrement, je tiens à le remercier pour son investissement tout au long de ces années. Il a réussi à me communiquer son enthousiasme pour la recherche. J'ai énormément appris à ses côtés et je pense maintenant grâce à lui bénéficier d'un excellent bagage pour pouvoir continuer dans cette voie. Son encadrement m'a permis de mener cette thèse à son terme avec des publications.

Mes remerciements vont également à mon pays, le Liban qui m'a donné la chance d'effectuer mon master Professionnelle parmi beaucoup des étudiants qui ont postulé pour être spécialisé en procréation médicalement assistée.

Merci à mes parents, Jean Abi Nahed et Ninette Al Maassry, qui m'ont toujours tout donné sans exception. C'est grâce à vous que j'en suis rendu là dans la vie et je vous en serai éternellement reconnaissant. Vous pouvez vous vanter d'avoir un fils qui est très heureux, et c'est la chose la plus importante qui soit. Merci à mes sœurs Nathalie et Nancy, qui viennent compléter cette belle famille que j'adore et qui est un modèle de persévérance. Merci aux meilleurs beaux-frères de la planète : Robert Cherro et Gilbert Karam. Merci pour tout ce que

vous m'apportez depuis longtemps et pour tout ce que vous vivez avec moi. Vous valez de l'or. A ma famille, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui, parce que vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenue. Vous avez tous contribué à votre manière à cette réussite. On forme une sacrée belle famille. Je vous aime. Peut-être à la fois une princesse et un super héros qui s'appelle une Maman, qui m'a supporté pendant les périodes d'examen et m'a merveilleusement bien accompagnée tout au long de mes études. Je t'aime maman. A Papa, un Papa Pas Possible, qui est toujours là quand j'en ai besoin et se met en quatre s'il le faut. Quelques lignes ne suffisent pas à faire une longue et belle phrase digne de toi alors juste merci, pour tout. Je t'aime que dieu te garde en bonne santé.

Je tiens à remercier tout particulièrement Dr. Mira HAZZOURI professeur adjointe à la faculté des sciences II Fanar et responsable du master biologie de la reproduction et ma deuxième mère, qui m'a aidé de trouver cette thèse, je suis très reconnaissant pour tes efforts ton soutien et ta confiance en moi je t'aime....

Je remercie Sandra Yassine une amie très proche qui a su me soutenir, me supporter, m'encourager, me donner un coup de main pour que je puisse réaliser mes expériences scientifiques à temps pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables. Cette thèse et moi te devons beaucoup. Je te souhaite une bonne continuation et une vie pleine de joie et de réussite. Mille merci Sandra tu es une sacrée personne.

Il y a une personne de très grande importance dans ma vie, qui m'accompagne et qui me soutient tout le temps par la force et l'énergie qui lui sont disponibles. Il s'agit de Jihad Karroum future ingénieur, un frère un ami, un colocataire. Il est toujours prêt à dire des niaiseries pour me calmer les nerfs et ça fonctionne! Son support tout au long de mon doctorat a été très apprécié. C'est dans l'épreuve que l'on reconnaît les vrais amis Une amitié véritable est celle qui jamais ne vous trahit Je sais que je peux compter sur toi mon ami, grand et fidèle. Merci d'être celui que tu es, ma reconnaissance est éternelle. Merci pour ton soutien et ta complicité. Merci de partager mon quotidien et de me remonter le moral quand il va mal. Merci de partager mes joies, mes peines. Merci de t'être intéressée à mon travail et d'avoir cherché avec moi des solutions.

Je tiens à remercier spécifiquement ma sœur Theresa Saadeh et Stéphanie Nehme ma meilleur amie. Vous étiez mon support en France. Vous m'avez fourni, tout au long de mon doctorat, un support grandement apprécié. Je vous aime.

J'aimerais remercier tous mes ami(e)s Libanais(e) qui sont en France et qui avec eux j'ai partagé les plus belles moments de ma vie, vous étiez ma famille mes frères et mes sœurs je vous aime : Mouhanad Massoud .Hassan Hallal, Mariame Raad, Bakhos Jneid, Hiba Melhem, Mariame Krit, Maha Moussa, Sawsan Khoury, Racha Hallal, Rida Awad, Hind Basbous, Mohamad Ali Makieh, Houssam Nesr, Mahmoud Hajj chhadé, Ali Ghaddar, Ali Youssef et



Elissar Issa, . Qui m'ont aidé à déconnecter durant les week-ends. Merci à tous pour tous ces bons moments.

Je n'oublie pas aussi les étudiants, les thésards et Post-Doc qui sont toujours là ou qui sont parti, mais qui m'ont beaucoup m'aidé Sandra, Jessica, Charles, Virginie, Aurélie, Sevcan Déborah, Kevin, Jean-Pascale , Lucie, Julien, Claire Mouhamad Ali Makieh, Jean-pascale et Guillaume.

Un grand remerciement à l'équipe du Docteur Gérard Lambeau, de l'institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire CNRS-UMR6097 de l'Université Nice-Sophia Antipolis qui m'a fournie les sPLA<sub>2</sub>, qui m'a inspiré sur des idées sur la perspective et la continuité du sujet. Son équipe travaille en collaboration avec nous sur l'identification et la caractérisation des sPLA<sub>2</sub>.

La présente étude n'aurait pas été possible sans le bienveillant soutien de certaines personnes. Et je ne suis pas non plus capable de dire dans les mots qui conviennent, le rôle qu'elles ont pu jouer à mes côtés pour en arriver là. Cependant, je voudrais les prier d'accueillir ici tous mes sentiments de gratitude qui viennent du fond de mon cœur, en acceptant mes remerciements.

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas citées mais qui ont été très importantes au cours de ces 3 années décisives dans ma vie. Par ce message amical je voudrais vous remercier Votre grand soutien et votre grande disponibilité m'ont vraiment touché J'espère un jour vous rendre la pareille, être à la hauteur de votre générosité Un grand merci à vous, votre geste j'ai beaucoup apprécié. J'adresse aussi mes remerciements à tous celles et ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail pour leur support, et leur confiance qui m'a poussé à réaliser un très bon travail. J'ai une pensée pleine de reconnaissance pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Ce travail est dédié à mon père Jean Abi Nahed et ma mère Ninette al Maassry. Je vous aime j'espère que vous acceptez ce petit cadeau qui était le rêve de votre fils.*

## *Liste des abréviations*

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : Calcium intracellulaire

2- OHCD : 2-hydroxypropyl-  $\beta$  –cyclodextrin

A23187 : ionophore calcique

AA : Arachidonique

AACOCF<sub>3</sub>: arachidonoyl trifluoromethyl ketone

ACs : adénylate cyclase soluble

ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease

AGI : les acides gras insaturés

AGS : les acides gras saturés

Akap4: A-Kinase Anchor Protein 4

ALH : l'amplitude du déplacement latéral de la tête

AMP : assistance médicale à la procréation

APL: Aminophospholipides

ARF: Factor d'ADP-ribosylation

ATP: Adenosine triphosphate

ATP: adénosine triphosphate

BEL: Bromoenol lactone

C1P: Céramide 1-phosphate

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CASA: Computer Assisted Semen Analysis

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

cGMP : cyclic guanosine monophosphate

CICR : Calcium Induced Calcium Release

COC : complexe ovocyte et cellules du cumulus

COX : cyclooxygénase

cPLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique

DAG: Diacyl-glycerol

DHA: acide docosahexaénoïque

DPA : acide docosapentanoïque

FE : feuillet externe

FI: feuillet interne

FIV: fécondation *in vitro*

GalTase  $\beta$ -galactosyltranferase

GPI-APS: Glycosyl Phosphatidylinositol– Anchored Protein

GPX5: glutathion peroxydase 5

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: bicarbonate

HDL: high density lipoprotein

iP3: inositol tri-phosphate

iPLA2: Phospholipase A2 calcium independent

KDa : Kilo dalton

KO : knock out

Lcn2 : Lipocaline2

LOX : lipooxygénase

lysoPC : lysophosphatidylcholines

MAFP : Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate

NSF: N-éthyl-maléimide sensitive factor

P4 : Progestérone

PA : acide phosphatidique

PC: phosphatidylcholine

PE: phosphatidyléthanolamine

PHi : pH interne

PI : la pièce intermédiaire

PI: phosphatidylinositol

PIP: phosphatidylinositol-4- phosphates

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-biphosphates

PKA: protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLA2 : phospholipase A2

PLC : Phospholipase C

PLD : Phospholipase D

PP : la pièce principale

PS : phosphatidylsérine

PSA : prostate-specific antigen

PT : la pièce terminale

RA : Réaction acrosomique

SM: sphingomyéline

SNARE: Soluble NSF Attachment protein REceptors

SOC: store-operated channel

SP56: Sperm Protein 56

SPESP1: Sperm Equatorial Segment Protein

sPLA2 : Phospholipase A2 sécrétée

SRB-1 : scavenger receptor de type B et de classe 1.

TGFp: Transforming Growth Factor P

VAMP: Vesicle Associated Membrane Proteins

VAP : velocity average path (vélocité moyenne du trajet)

V-ATPase : pompe à protons de type vacuolaire

VCL : curvilinear velocity (vélocité curvilinéaire)

vPLA2 :sPLA2 de venins

VSL : velocity straight line (vélocité linéaire)

ZP : Zona Pellucida



# Sommaire

Avant-propos.....	3
Liste des abréviations .....	6
1. Chapitre1 : Le spermatozoïde.....	18
1.1. La tête du spermatozoïde :.....	18
1.1.1. Le noyau .....	18
1.1.2. L'acrosome .....	19
1.2. Le flagelle.....	20
1.2.1. La pièce intermédiaire et la pièce principale .....	21
2. Chapitre 2 : Maturation épидидymaire : .....	23
2.1. Organisation fonctionnelle de l'épididyme .....	23
2.1.1. Anatomie : .....	23
2.1.2. Histologie : .....	24
2.2. La physiologie de l'épididyme : .....	25
2.2.1. Fonctions de l'épididyme .....	26
2.2.2. Le remodelage des lipides membranaires.....	27
2.3. Rôle des glandes annexes sur les spermatozoïdes .....	30
2.4. Conclusion.....	31
3. Chapitre 3 : Les systèmes de transport ionique du spermatozoïde .....	33
3.1. Les ATPase membranaires .....	33
3.2. Les co-transporteurs .....	33
3.3. Les canaux ioniques .....	34
3.3.1. Les canaux sodiques.....	34
3.3.2. Les canaux potassiques.....	34
3.3.3. Les canaux chlorures .....	35
3.3.4. Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (canaux CNG) .....	36
3.4. Diversité des canaux calciques présents au niveau du spermatozoïde .....	36
3.4.1. Les canaux calciques dépendant du potentiel :.....	36

3.4.2.	Les canaux de type SOC « Store Operated Channels » .....	37
3.4.3.	Les canaux calciques du réticulum (iP3R, Ryanodine RyR).....	37
4.	Chapitre 4 : La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes .....	39
4.1.	Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation.....	40
4.1.1.	La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation .....	40
4.2.	La membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation .....	41
4.2.1.	Efflux de cholestérol.....	41
4.2.2.	Redistribution du cholestérol.....	42
4.2.3.	Réorganisation des phospholipides .....	42
4.3.	Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane .....	44
4.4.	Les différents ions .....	44
4.5.	Mécanisme moléculaire de la capacitation :.....	47
4.6.	L'hyperactivation flagellaire .....	48
4.7.	Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique après capacitation.....	49
4.7.1.	Mécanisme moléculaire de l'hyperactivité flagellaire.....	50
5.	Chapitre 5 : La réaction acrosomique (RA).....	53
5.1.	Liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide .....	54
5.2.	Déroulement de la réaction acrosomique .....	55
5.2.1.	Protéine SNARE.....	56
5.3.	Mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique .....	57
5.3.1.	Le calcium et la réaction de l'acrosome.....	59
5.4.	Mécanismes d'action des différents acteurs de la RA .....	60
5.4.1.	La réaction acrosomique induite par la progestérone : .....	60
5.4.2.	Mécanisme d'action des PLA2 : .....	61
6.	Chapitre 6 : Les Phospholipases.....	63
6.1.	Introduction .....	63
6.1.1.	Les phospholipases A1 .....	63
6.1.2.	Les phospholipases C .....	64
6.1.3.	Les phospholipase D.....	65

6.1.4.	Les phospholipases A2 .....	65
6.1.4.1.	Les phospholipases A2 intracellulaires .....	66
6.1.4.1.1.	Les PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium (cPLA2).....	67
6.1.4.1.2.	Les PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium (iPLA2) .....	68
6.1.4.2.	Les phospholipases A2 sécrétées.....	68
6.2.	Mécanismes d'activation des différents types de PLA2.....	70
6.2.1.	Phospholipase A2 Cytosolique (cPLA2).....	70
6.2.1.1.	Activation calcique.....	70
6.2.1.2.	Activation par PIP2 et C1P.....	70
6.2.1.3.	Phosphorylation.....	70
6.2.2.	Phospholipases A2 Calcium-indépendantes (iPLA2).....	70
6.2.2.1.	Activation des iPLA2 par l'ATP .....	71
6.2.2.2.	Inhibition des iPLA2 par la calmoduline.....	71
6.2.2.3.	Activation des iPLA2 par l'oligomérisation.....	71
6.2.1.	Phospholipase A2 Sécrétées (sPLA2) .....	71
6.3.	Les récepteurs des phospholipases A2 sécrétées .....	71
6.3.1.	Les récepteurs de type N.....	72
6.3.2.	. Le récepteur de type M.....	72
6.4.	Inhibiteurs chimiques .....	74
6.4.1.	Premiers développements d'analogues phospholipidiques .....	74
6.4.2.	Indoles .....	74
6.4.3.	Trifluorométhyl Cétones, Polyfluorocétones et Tricarbonyles .....	74
6.4.4.	Pyrroles et Pyrrolidines .....	75
6.4.5.	Méthyl Fluorophosphonates .....	75
6.4.6.	Bromoénol Lactone .....	75
6.4.7.	Produits naturels .....	75
6.4.8.	Autres inhibiteurs .....	76
6.5.	Fonction des Phospholipases dans le cadre de la biologie de la reproduction .....	77
6.5.1.	L'intérêt de la sPLA2 du groupe X (sPLA2-X) .....	77



6.5.2.	La cPLA2 .....	79
6.5.3.	L'iPLA2.....	79
6.5.4.	La phospholipase D .....	79
6.5.5.	La phospholipase B .....	80
6.6.	Autres fonctions biologiques des phospholipases .....	80
6.6.1.	Fonctions antivirale et anti bactérienne des sPLA2 (Groupes sPLA2 I, II, III, V, et X)...	80
6.6.2.	Hydrolyse des phospholipides.....	80
6.6.3.	Coagulation .....	81
6.6.4.	Inflammation .....	81
6.6.5.	Cancer.....	81
6.7.	Conclusion.....	81
7.	Chapitre 7 : La fécondation et le développement embryonnaire chez la souris .....	84
7.1.	L'adhésion et la fusion dans l'interaction gamétique et les acteurs moléculaires .....	85
7.1.1.	L'adhésion cellulaire .....	85
7.1.2.	La fusion cellulaire.....	86
7.2.	Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique .....	86
7.2.1.	Les acteurs ovocytaires.....	87
7.2.1.1.	□La famille des tétraspanines .....	87
7.2.1.1.	Les tétraspanines : CD9 et CD81 .....	87
7.2.1.2.	Les Intégrines .....	87
7.2.1.2.1.	Rôle des intégrines dans la fécondation .....	88
7.2.1.2.2.	Les Ancres membranaires : GPI-anchored proteins .....	88
7.2.2.	Les acteurs spermatiques .....	88
7.2.2.1.	□La famille des ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) .....	88
7.2.2.1.1.	Rôle des ADAMs dans l'interaction gamétique .....	89
7.2.2.1.2.	SPESP1 (Sperm Equatorial Segment Protein).....	89
7.2.2.1.3.	Izumo1 est une protéine clé de la fécondation.....	89
7.3.	Réaction corticale de l'ovocyte fécondé.....	91
7.4.	Activation ovocytaire .....	92
7.4.1.	Le calcium, inducteur ou organisateur des événements de l'activation .....	93

7.4.2.	Amphimixie et déclenchement du développement embryonnaire.....	93
7.5.	Rappel du timing du développement embryonnaire pré-implantatoire de la souris (0-4 jours) 96	
8.	Problématique et Objectifs .....	100
	Article 1:.....	105
	Article 2.....	115
	Résultats en voie de soumission pour publication:.....	167
	Discussion et perspectives.....	178
	ANNEXE.....	182
	Références bibliographiques .....	208

## Liste des Tables

Tableau 1 : Noms et formules chimiques de quelques AG communément rencontrés dans les membranes cellulaires .....	29
Tableau 2: La grande famille des Phospholipases A2.....	66
Tableau 3: Classification des phospholipases A2 intracellulaires.....	67
Tableau 4: les phospholipases A2 sécrétés.....	69
Tableau 5:Classification des phospholipase A2 et les pathologies associées aux phospholipase A2 sécrétées .....	82
Tableau 6: les différents inhibiteurs de PLA2 utilisé couramment .....	83
Tableau 7 : Etapes majeures du développement embryonnaire pré-implantatoire et intra-utérin chez la souris. ....	98

## Liste des Figures

Figure 1 : schéma montrant la structure de spermatozoïde murin : la tête et le flagelle. (Darszon et al., 2011).....	19
Figure 2 : Représentation schématique d'un spermatozoïde de Mammifère (www.embryology.ch) ...	20
Figure 3 : Structure de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde de mammifère.....	21
Figure 4 : Aspect en microscopie électronique à transmission d'une coupe transversale d'axonème. .	22
Figure 5 : Anatomie de l'épididyme murin. ....	23
Figure 6 : Représentation schématique des différents types cellulaires composants l'épithélium du segment initial).....	24
Figure 7 : Formules chimiques de la phosphatidylcholine (PC), choline plasmalogène et de la sphingomyéline (SM) .....	28
Figure 8: Représentation schématique de la distribution des canaux ioniques dans le spermatozoïde de mammifères. ....	38
Figure 9 : Redistribution du cholestérol .....	42
Figure 10 : Organisation des lipides et phospholipides de la membrane plasmique. ....	43
Figure 11:Schéma montrant les différents Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères .....	45
Figure 12:Modèle de l'interaction des entrées de calcium.....	47
Figure 13 : Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la capacitation.....	48
Figure 14 : Illustration de la vitesse curvilinéaire (VCL), la vitesse linéaire (VSL), la vitesse moyenne du trajet (VAP), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH). ....	49
Figure 15 : Schéma résumant les principaux facteurs impliqués dans la régulation du mouvement flagellaire.....	51
Figure 16: schéma qui montre les grandes étapes de la capacitation .....	52
Figure 17 : Microscopie électronique de spermatozoïdes de souris montre les différentes étapes de la réaction acrosomique.....	54
Figure 18 : Composition de la zone pellucide .....	55
Figure 19 : Représentation schématique classique des étapes de la réaction acrosomique .....	56
Figure 20 : Représentation schématique du cycle de fonctionnement des protéines SNAREs .....	57
Figure 21 : Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la réaction acrosomique .....	58
Figure 22 : Les modifications ioniques durant la réaction acrosomique .....	60

Figure 23 : Schéma qui montre la réaction acrosomique induite par la progestérone :.....	61
Figure 24 : Action des acides gras polyinsaturés(PUFA) sur la syntaxine (Darios et al., 2007).....	62
Figure 25 : Les différents sites d'action des phospholipases sur les phospholipides membranaires.....	63
Figure 26 : Une réaction catalysée par les PLA2 donnant un acide gras et un lysophospholipide (Lambeau and Gelb, 2008).....	65
Figure 27 : Structure schématique et fonctions moléculaires possibles de PLA2R1. ....	73
Figure 28 : Localisation des sPLA <sub>2</sub> au niveau de l'organe reproducteur mâle et du tubule séminifère de souris. D'après (Masuda et al., 2004).....	78
Figure 29 : Mécanisme de la fécondation. (Okabe, 2013).....	84
Figure 30 : Schéma récapitulatif des principaux acteurs protéiques .....	91
Figure 31 : La réaction corticale chez la souris .....	92
Figure 32 :La fusion de la membrane du spermatozoïde avec celle de l'ovocyte.....	94
Figure 33 : Schéma qui nous rappelle des différentes étapes de changement physiologique .....	95
Figure 34 : Schéma qui résume les grandes étapes de la fécondation.....	96
Figure 35 : Développement pré - implantatoire de l'embryon de souris.....	97
Figure 36 : Graphe montrant l'augmentation de la demande sur les techniques de PMA .....	100

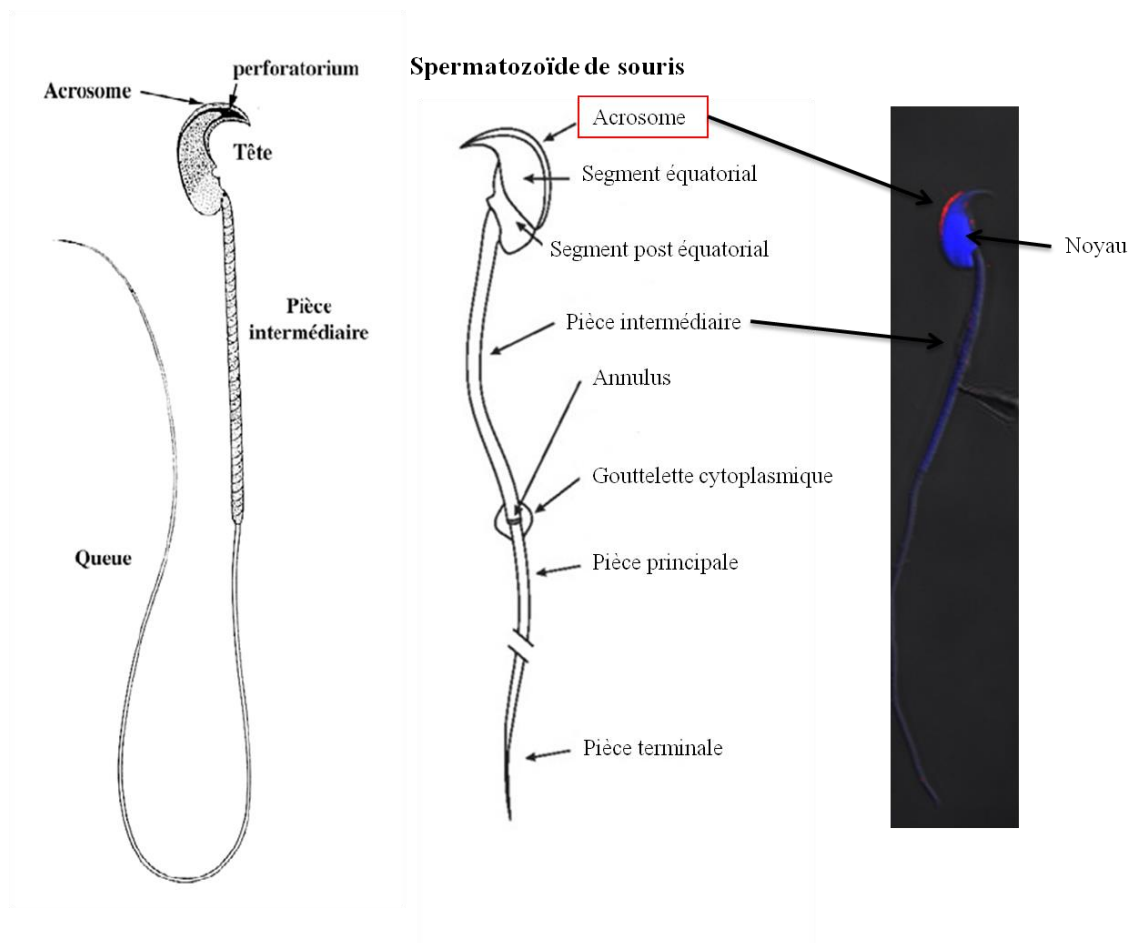
## ***1. Chapitre1 : Le spermatozoïde***

Le spermatozoïde, est une cellule haploïde mobile. Il est produit par les gonades mâles les testicules, et intervient dans la reproduction des espèces. La spermatogenèse, ou formation des spermatozoïdes, se déroule au sein des tubules séminifères situés dans les testicules. Elle s'effectue à partir de cellules souches, les spermatogonies, qui se multiplient par simple division cellulaire. Les spermatogonies se transforment en spermatide par deux divisions de méiose. Ces derniers, vont subir une phase de maturation, appelée spermiogénèse, pour donner naissance aux spermatozoïdes. Cette dernière phase permet au spermatozoïde d'acquérir les structures cellulaires nécessaires à l'interaction gamétique et la fécondation (acrosome, flagelle) et de modifier son noyau. La spermatogenèse débute à la puberté. La taille d'un spermatozoïde de souris est de 100 à 150  $\mu\text{m}$ , il est capable à se déplacer grâce à son flagelle.

### ***1.1.La tête du spermatozoïde :***

#### ***1.1.1. Le noyau***

La tête du spermatozoïde est constituée d'un noyau haploïde dont l'ADN présente un haut degré de compaction. Ceci ne permet pas les mécanismes de transcription et traduction dans le gamète mature. Le noyau est donc dans un état quiescent. Ce haut degré de compaction est obtenu grâce au remplacement progressif des histones par des protamines durant la spermiogénèse et la maturation des spermatides. Ainsi, le noyau devient de plus en plus petit, se condense et sa forme se modifie. Vu d'en haut le noyau est ovale, de profil en crochet. Il est coiffé à sa partie antérieure par l'acrosome. (**Figure 1**)



**Figure 1** : schéma montrant la structure de spermatozoïde murin : la tête et le flagelle. (Darszon et al., 2011).

### 1.1.2. L'acrosome

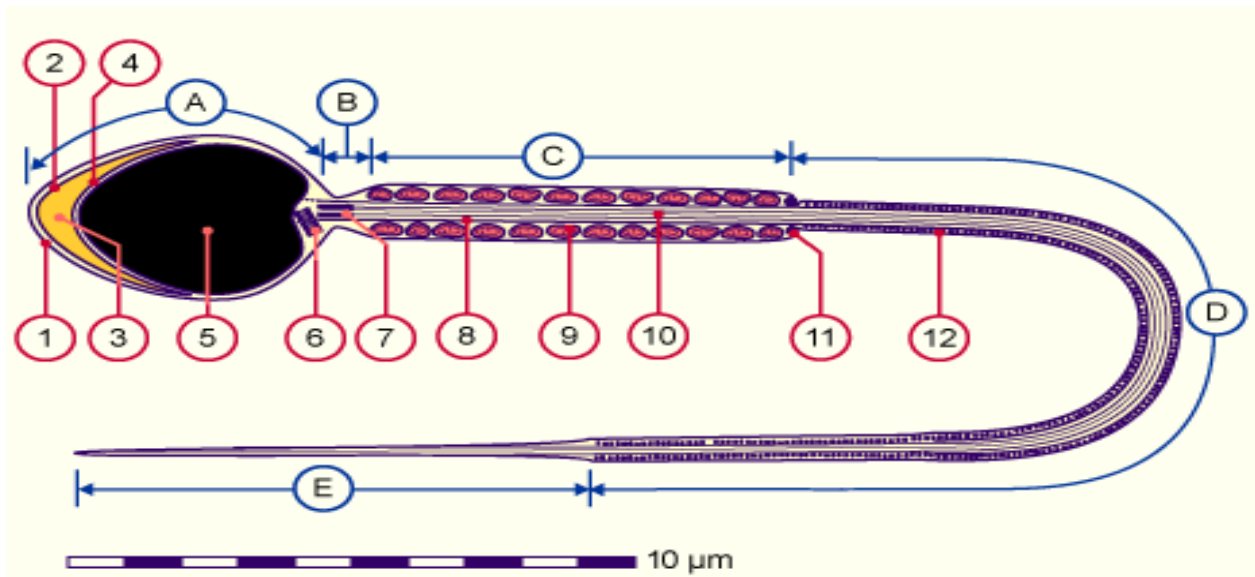
Il se développe à partir de vésicules dites pro-acrosomiques qui se détachent de l'appareil de Golgi, fusionnent pour donner une vésicule unique, le capuchon acrosomique, qui s'étale au contact du noyau. Le contenu vésiculaire forme un granule dense qui progressivement grossit et remplit toute la cavité du capuchon. Cette grande vésicule contient des enzymes comme la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, les hyaluronidases Spam1, Hyal5 et Hyalp1 (Reitinger et al., 2007), la phosphatase acide et l'acrosine qui coupe les pontages entre les protéines de la zone pellucide (ZP1, ZP2 et ZP3) entourant l'ovocyte (Mao and Yang, 2013). L'exocytose des enzymes de cette vésicule, appelée réaction acrosomique, est déclenchée par la liaison de récepteurs spermatiques aux glycoprotéines de la zone pellucide. Chez la souris c'est ZP3 qui déclenche la réaction acrosomique (Arnoult et al., 1999). Cependant, au cours de l'année 2011, deux articles ont changé cette vision classique (Inoue et al., 2011; Jin et al., 2011) en montrant 1/ que la majorité des spermatozoïdes qui traversent la ZP ont en fait réalisé leur RA au niveau du cumulus oophorus et 2/ que des spermatozoïdes ayant déjà traversés la ZP et récupéré entre la membrane plasmique de l'ovocyte et la ZP pouvaient de nouveau retraverser la ZP d'ovocytes non fécondés.

## 1.2. Le flagelle

Le flagelle est une structure tubulaire qui confère un mouvement oscillatoire au spermatozoïde. Ce mouvement est nécessaire à son déplacement lors de son parcours vers l'ovocyte. L'énergie produite par les mitochondries situées dans la pièce intermédiaire permet le maintien de ce mouvement. Dès les phases précoces de la spermiogénèse, la formation du flagelle débute par l'allongement de l'axonème à partir d'un des deux centrioles.

Les anomalies de structure du flagelle peuvent entraîner des anomalies de mouvement, occasionnant des difficultés d'interaction des gamètes car le rendement locomoteur est alors très réduit et tout obstacle devient insurmontable (akinésie ou dyskinésie flagellaire).

Le flagelle présente trois parties, la pièce intermédiaire (PI), la pièce principale (PP) et la pièce terminale (PT) (**Figure 2**).



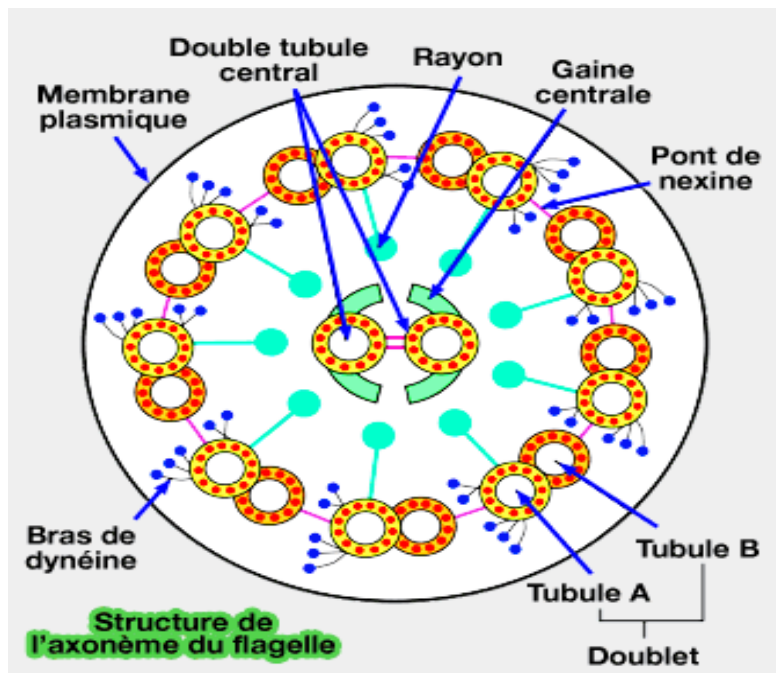
**Figure 2 :** Représentation schématique d'un spermatozoïde de Mammifère ([www.embryology.ch](http://www.embryology.ch))

**1 :** Membrane plasmique, **2 :** Membrane acrosomiale externe, **3 :** Acrosome, **4 :** Membrane acrosomiale interne, **5 :** Noyau, **6 :** Centriole proximal, **7 :** Restes du centriole distal, **8 :** Faisceaux longitudinaux extérieurs denses, **9 :** Mitochondrie, **10 :** Axonème, **11 :** Annulus, **12 :** Fibres denses externes. **A :** Tête, **B :** Collet, **C :** Pièce intermédiaire, **D :** Pièce principale, **E :** Pièce terminale



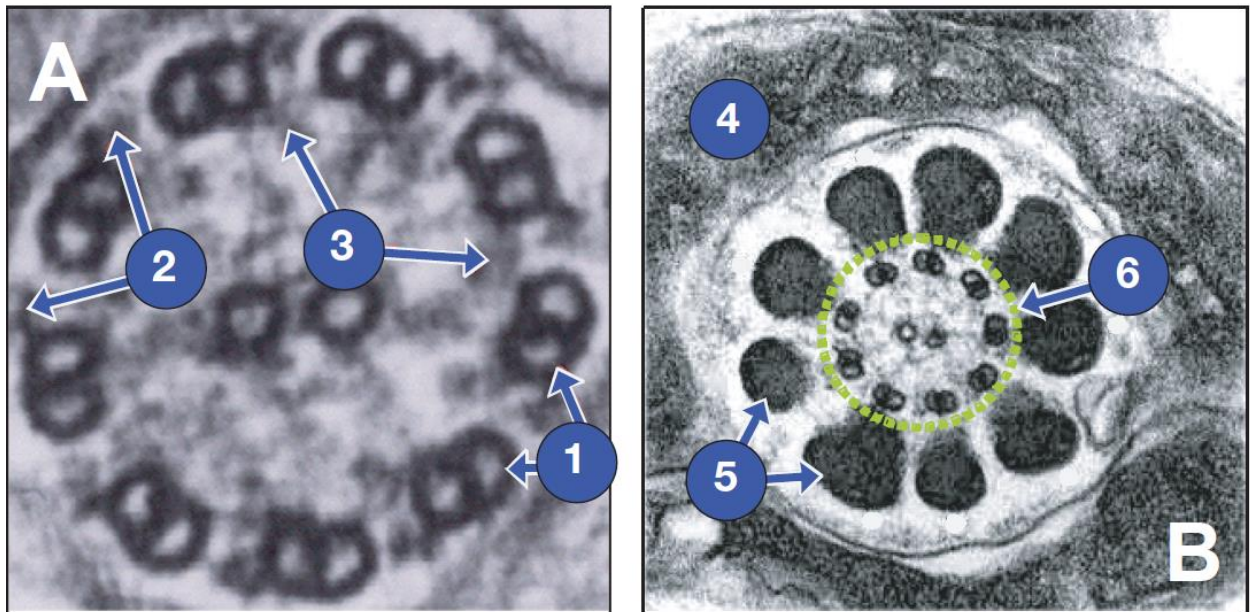
### 1.2.1. La pièce intermédiaire et la pièce principale

La pièce intermédiaire est composée de deux types de structures : la gaine de mitochondries qui va produire une partie de l'énergie grâce à la phosphorylation oxydative qui produit de l'ATP et l'axonème, véritable appareil locomoteur du spermatozoïde, s'étendant tout au long du flagelle, est composé de 9 paires de microtubules disposées autour d'une paire centrale (9+2) (Ho and Suarez, 2001). Les bras de dynéine internes et externes sont des expansions s'étendant d'un doublet vers le doublet voisin. (**Fig. 3**).



**Figure 3 :** Structure de l'axonème du flagelle d'un spermatozoïde de mammifère L'axonème, est limitée par une membrane plasmique et contient une matrice dans laquelle se trouvent des microtubules longitudinaux, rectilignes et parallèles les uns aux autres. Un double microtubule central, de faible longueur, qui se termine dans la partie proximale de l'axonème, entouré d'une gaine centrale. Neuf paires de tubules périphériques (tubule A et B). Le tubule A (en général plus petit) porte deux bras formés de dynéine (qui peuvent s'attacher transitoirement au tubule B du doublet voisin) et possède un rayon, fibres à disposition radiale se terminant par un renflement. Les tubules sont formés de protofibrilles de tubuline (A et B). Les 9 doublets sont reliés entre eux par des ponts de nexine.( [www.vetopsy.fr](http://www.vetopsy.fr))

Dans la région de la pièce intermédiaire, l'axonème est entouré par 9 fibres denses externes puis par les mitochondries disposées en spirale (**Fig 4**). Au-delà de la pièce intermédiaire se trouve la pièce principale. A ce niveau l'axonème est entouré par les structures périaxomiales suivantes : les fibres denses, la gaine fibreuse et deux colonnes longitudinales.



**Figure 4** : Aspect en microscopie électronique a transmission d'une coupe transversale d'axonème (A) et d'une coupe transversale de flagelle au niveau de la pièce intermédiaire (B).

**1** : Paires de microtubules, **2** : Bras externes de dynéine, **3** : Bras internes de dynéine, **4** : Mitochondries, **5** : Fibres denses, **6** : Axonème (d'après Cahier d'infertilité masculine)

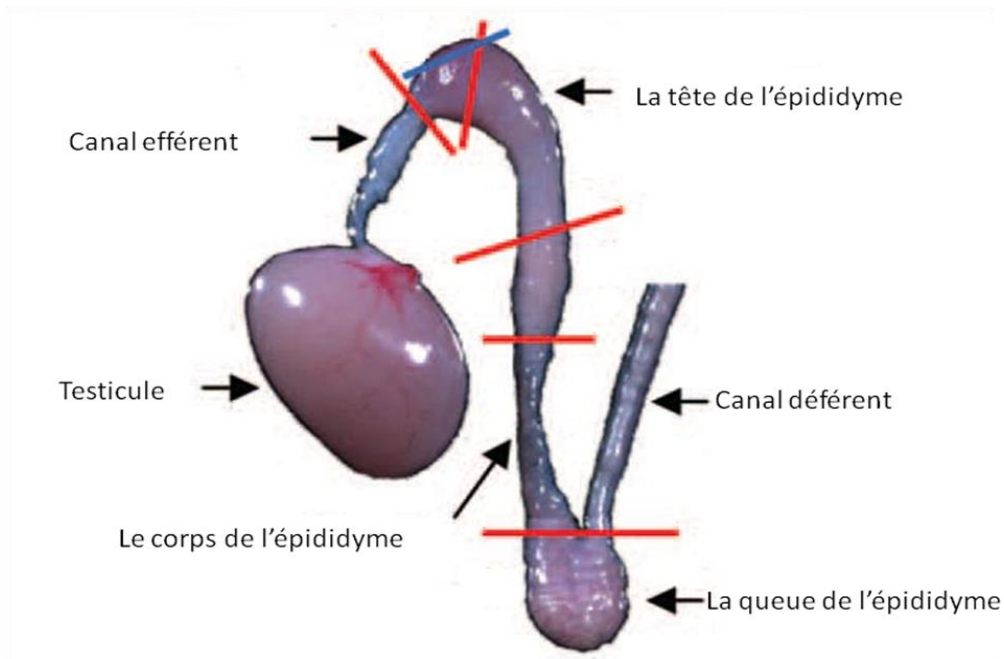
Lorsque les spermatozoïdes sont émis dans la lumière des tubes séminifères, bien que le flagelle soit formé, les spermatozoïdes sont très peu mobiles et incapables de féconder un ovocyte. La maturation des cellules se poursuit dans l'épididyme, permettant entre autres l'acquisition progressive du mouvement.

## 2. Chapitre 2 : Maturation épидидymaire :

### 2.1. Organisation fonctionnelle de l'épididyme

#### 2.1.1. Anatomie :

L'épididyme, est un long canal unique en circonvolution, de longueur variable selon les espèces (1 à 60 m, respectivement chez la souris et le ver rat), situé sur la face postérieure du testicule (**Fig.5**). Sur la base de sa morphologie et de son histologie, cet organe hautement différencié peut être divisé chez les mammifères, en trois régions anatomiquement distinctes : la tête (région proximale), reliée au hile du testicule par les canaux efférents ; le corps (partie médiane) et la queue (région distale), en continuité avec le canal déférent

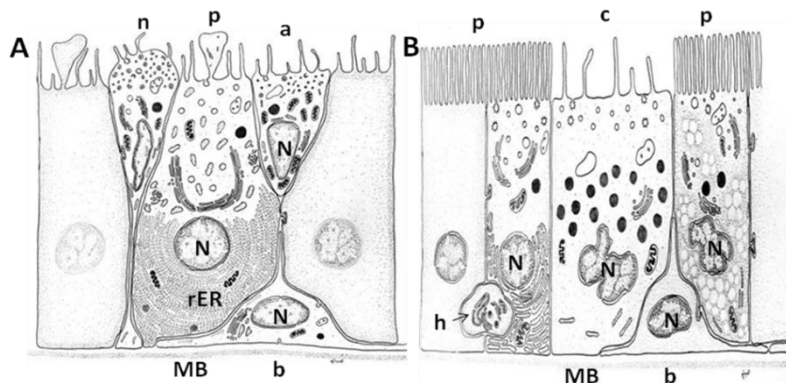


**Figure 5 :** Anatomie de l'épididyme murin.

La tête (région proximale), reliée au hile du testicule par les canaux efférents ; le corps (partie médiane) et la queue (région distale), en continuité avec le canal déférent (Lin et al., 2013) modifié

### 2.1.2. Histologie :

Le canal épидидymaire comprend deux compartiments : un épithélium pseudo-stratifié reposant sur un chorion de tissu conjonctif richement innervé et vascularisé, lui-même entouré de 2 à 6 couches de fibres musculaires lisses (Robaire, 2006); et une lumière bordée par cet épithélium. Cinq types cellulaires entrent dans la composition de l'épithélium épидидymaire (**Fig.6**) et présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du tubule.



**Figure 6 :** Représentation schématique des différents types cellulaires composant l'épithélium du segment initial (**A**) et de la tête (**B**) de l'épididyme. Modifié (Robaire, 2006)

**a** : cellule apicale ; **b** : cellule basale ; **c** : cellule claire ; **h** : cellule en halo ; **n** : cellule étroite « narrow cell » ; **p** : cellule principale ; **MB** : membrane basale ; **N** : noyau ; **rER** : réticulum endoplasmique rugueux.

Ces événements de maturation post-testiculaire sont le résultat d'une constante interaction entre les gamètes mâles et l'environnement spécifique du fluide épидидymaire, composé principalement de protéines synthétisées et sécrétées de manière hautement régionalisée par l'épithélium épидидymaire. Les connaissances moléculaires du processus de maturation sont encore très partielles.

Les cellules principales :

Les cellules principales, les plus nombreuses, constituent 65-80 % de la population de cellules épithéliales épидидymaire totale. Leur hauteur est plus élevée dans la tête que dans la queue de l'épididyme, tout comme la longueur des microvillosités qui tapissent leur pôle apical (Jones et al., 1979). Ces cellules, reliées entre elles par des jonctions serrées et des desmosomes, sont très actives dans le transport et la sécrétion de protéines ; et la réabsorption du fluide épидидymaire (Cooper, 1998; Robaire and Viger, 1995).

Les cellules basales :

Elles représentent 10-20 % de la population cellulaire épидидymaire totale. Ces petites cellules allongées, localisées tout le long du canal épидидymaire, reposent sur la membrane basale formant ainsi un réseau en dessous des cellules principales. Leur fonction est inconnue mais il semblerait, qu'elles jouent un rôle dans l'élimination des radicaux libres ainsi que dans la

protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épididymaire (Seiler et al., 2000). Le microenvironnement spécifique présent dans la lumière du tubule est essentiel à la maturation des spermatozoïdes. La composition du liquide séminal, qui varie le long de l'épididyme, est maintenue grâce à la barrière hémato-épididymaire (Cyr et al., 1995), qui permet de réguler l'entrée ou la sortie de molécules et de contrôler la composition du fluide luminal par des mécanismes d'absorption et de sécrétion.

Cette barrière résulte de la présence de jonctions serrées qui forment un anneau étanche autour des cellules principales de l'épithélium (Cyr et al., 1995). Ces jonctions serrées sont composées de différentes protéines. Le développement de la barrière hémato-épididymaire est progressif : ce n'est qu'au jour 21, chez le rat, que les jonctions serrées deviennent étanches et la barrière imperméable. Cependant l'intégrité de la barrière peut être compromise avec l'âge suite à des modifications de différentes protéines jonctionnelles. Cette baisse d'intégrité de la barrière hémato-épididymaire est accompagnée d'une baisse de la spermatogenèse, de la stéroïdogénèse et de la qualité du sperme. Malgré l'importance de la barrière hémato-épididymaire et des interactions intercellulaires dans la maturation épididymaire, il existe très peu de modèles *in vitro* pour étudier le rôle précis des différents types de cellules.

Les cellules en halo :

Identifiées comme des lymphocytes intra-épithéliaux ou des monocytes (Hoffer and Hinton, 1984; Serre and Robaire, 1999), ces cellules sont disséminées tout le long du canal épididymaire qui ont un rôle dans la défense immunitaire.

Les cellules claires :

Qualifiées ainsi en raison de la localisation de leur noyau dans le tiers apical des cellules, les cellules apicales présentent, quant à elles, un cytoplasme dense, très riche en mitochondries, contenant des lysosomes et de l'anhydrase carbonique impliquée dans la sécrétion des ions  $H^+$  et la réabsorption des bicarbonates ( $HCO_3^-$ ). Elles seraient ainsi responsables de l'acidification du fluide épididymaire (Martinez-Garcia et al., 1995). Selon leur localisation épididymaire, leur aspect et leur nom varient et les cellules apicales sont alors appelées cellules étroites ou « narrow cells »

## *2.2. La physiologie de l'épididyme :*

Les cellules principales, étroites et claires ont un rôle essentiel dans l'établissement d'un environnement optimal pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes (Chakrabarti et al., 2007; Hinton and Palladino, 1995). Ces cellules épithéliales créent un micro environnement dans lequel les spermatozoïdes acquièrent leur mobilité, leur capacité de



fécondation des ovocytes, et dans lequel ils sont stockés dans un mode quiescent (Chakrabarti et al., 2007) . Dans les canaux efférents, les mouvements ciliaires des cellules réparties le long de la lumière assurent le transport des spermatozoïdes. Le stockage des spermatozoïdes s'effectue dans la partie distale de l'épididyme. Dans la plupart des espèces, les spermatozoïdes sont potentiellement mobiles mais en réalité immobiles dans la queue (Hinton and Palladino, 1995). La composition ionique, le pH, la présence de macromolécules comme l'immobiline permettent l'établissement d'un état de dormance du spermatozoïde (Hamamah and Gatti, 1998; Usselman et al., 1985) . Les spermatozoïdes qui ne sont pas éjaculés s'altèrent en vieillissant, puis sont lysés et phagocytés. La maturation finale des spermatozoïdes a lieu en dehors des gonades, dans l'épididyme, l'interaction des spermatozoïdes avec l'environnement de la lumière de l'épididyme qui est responsable de ces dernières phases (Dacheux et al., 2005; Gatti et al., 2004; Jones and Murdoch, 1996; Olson and Orgebin-Crist, 1982; Yeung et al., 1993). Cet environnement favorable est créé par les cellules étroites, claires et principales (Chakrabarti et al., 2007; Gong et al., 2000; Hinton and Palladino, 1995). Ce processus de maturation est un phénomène dynamique actif en ce sens que les spermatozoïdes doivent être exposés aux différentes parties de l'épididyme pour devenir matures.

### *2.2.1. Fonctions de l'épididyme*

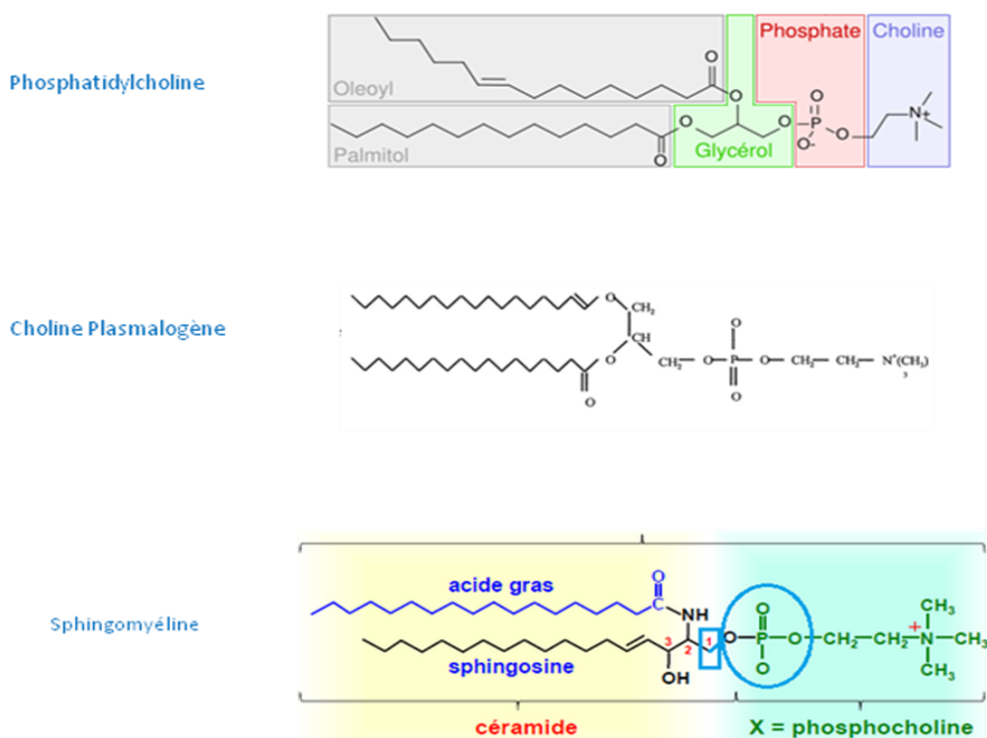
A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes sont non fécondants et très peu mobiles. Ils sont également inactifs d'un point de vue de la synthèse protéique car leur ADN, déjà fortement condensé lors de la spermiogénèse, est soumis à une condensation accrue durant la maturation épididymaire, grâce à la formation de ponts disulfures au niveau des protamines. De plus, le cytoplasme résiduel appelé gouttelette cytoplasmique présent à la surface des spermatozoïdes se détache et est réabsorbé au niveau de la queue de l'épididyme (Cooper and Yeung, 2003). C'est au cours de leur transit à travers l'épididyme que les spermatozoïdes subissent de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques. Ceci se traduit essentiellement par la modification de protéines membranaires du spermatozoïde, suite à l'action d'enzymes présentes dans le fluide (glycosidases, glycosyltransférases, protéases) (Tulsiani, 2006).

Une des fonctions de l'épididyme est la protection des spermatozoïdes matures, qui sont les cibles de multiples agressions. La barrière hémato-épididymaire les protège contre les attaques du système immunitaire (Pollanen and Cooper, 1994) et certaines protéines sécrétées par l'épithélium épididymaire ont, quant à elles, une action protectrice contre les dommages protéolytiques et oxydatifs. La barrière hémato-épididymaire protégerait ainsi les spermatozoïdes de dommages protéolytiques, qui pourraient avoir lieu lors d'une libération prématurée des enzymes acrosomiales durant le transit épididymaire. D'autres protéines, telle que la glutathion peroxydase 5 (GPX5), est supposée protéger les spermatozoïdes contre les dommages oxydatifs (Vernet et al., 1996; Vernet et al., 1999). En effet, au cours du métabolisme oxydatif normal, des radicaux superoxydes apparaissent. Ils sont ensuite transformés sous l'action du superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène, principale source de radicaux hydroxyl. Ces derniers sont responsables de la peroxydation des acides gras insaturés, particulièrement représentés dans la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ceci stimule l'activité de la phospholipase A2 (voir chapitre 6 pour description des phospholipases), impliquée dans l'initiation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Bize et al., 1991)

L'épididyme possède donc plusieurs fonctions. Il permet le transport des gamètes mâles des canaux efférents au canal déférent. Il contrôle également leur maturation qui permet le développement de la motilité et l'acquisition du pouvoir fécondant. L'épididyme joue aussi un rôle important pour la protection et la survie des spermatozoïdes qui sont des cellules fragiles pour lesquelles le maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité tout le long de cet organe est essentiel. Dans ce cadre, deux phases sont critiques : leur transit qui dure environ 10 jours chez la souris, et leur stockage dans la queue de l'épididyme entre deux éjaculations. L'épididyme permet le transport des spermatozoïdes, grâce à la pression hydrostatique provenant du fluide testiculaire. A côté de ce mécanisme, les contractions péristaltiques des muscles lisses présents à la périphérie des tubules épididymaires, et les mouvements des stéréocils situés à la surface des cellules principales participent à la progression de ces cellules. La queue de l'épididyme est le lieu de stockage des gamètes mâles entre chaque éjaculation chez la plupart des espèces. Pendant ce stockage, les spermatozoïdes sont soumis à différentes agressions. Cette région possède une température et une pression partielle en oxygène inférieures à celles présentes dans la tête de l'épididyme. Ces caractéristiques permettent ainsi de préserver les spermatozoïdes d'une réaction acrosomique précoce.

### *2.2.2. Le remodelage des lipides membranaires*

Au cours de sa progression dans l'épididyme, le spermatozoïde subit une perte de son contenu total en phospholipides. Cette diminution du niveau de phospholipides dans les spermatozoïdes a d'ailleurs été rapportée chez plusieurs espèces. Par exemple, le contenu en phospholipides des spermatozoïdes diminue de 29% (Rejraji et al., 2006) chez le bœuf (Scott et al., 1967), de 33% chez la chèvre (Rana et al., 1991), de 53% chez le bovin (Poulos et al., 1973) et de 54% chez le rat (Avelano et al., 1992). Le niveau de phospholipides varie toutefois de façon différente selon le type de phospholipide. Ainsi, chez ces mêmes espèces, le contenu de phosphatidyléthanolamine (PE), de phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol (PI) dans les spermatozoïdes diminue fortement (de l'ordre de plus de 50%) tandis que les niveaux de sphingomyéline (SM), de phosphatidylcholine (PC) et plasmalogène choline diminuent plus faiblement (de l'ordre de 10 à 40%). Par conséquent, le SM, le PC et le plasmalogène choline sont les phospholipides prédominants dans les membranes des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (**Fig 7**).



**Figure 7 :** Formules chimiques de la phosphatidylcholine (PC), choline plasmalogène et de la sphingomyéline (SM). Les plasmalogènes forment un groupe de phospholipides à résidu aldéhyde, contenant un AG estérifié avec un glycérol et un ester insaturé à longue chaîne carbonée. Leur hydrolyse donne un aldéhyde gras et un AG. La choline plasmalogène, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline possèdent le même groupement polaire phosphorylcholine

Par ailleurs, la proportion de phospholipides insaturés dans la membrane plasmique des spermatozoïdes augmente lors de la maturation épидидymaire. En effet, les proportions des acides arachidonique et docosahexaénoïque, deux acides gras polyinsaturés, augmentent significativement dans les membranes des spermatozoïdes. Chez la souris, les acides gras saturés (AGS) diminuent sensiblement, alors que les acides gras insaturés (AGI) (surtout acide docosapentanoïque (DPA) et acide docosahexaénoïque (DHA)) augmentent au cours de la maturation épидидymaire accentuant ainsi la diminution du ratio AGS/AGI (**Tableau : 1**) (Rejraji et al., 2006)



**Tableau 1** Noms et formules chimiques de quelques AG communément rencontrés dans les membranes cellulaires (Rejraji et al., 2006)

Noms chimiques (vulgarisés)	Formules	Noms usuels
<b>Acides gras saturés</b>		
Tétradécanoïque	14 : 0	Myristique
Hexadécanoïque	16 : 0	Palmitique
Octodécanoïque	18 : 0	Stéarique
Eicosanoïque	20 : 0	Arachidique
Docosanoïque	22 : 0	Béhénique
Tétracosanoïque	24 : 0	Lignocérique
<b>Acides gras insaturés</b>		
Octadécénoïque	18 : 1n-9 (cis)	Oléique
Octadécadiénoïque	18 : 2n-6 (cis)	Linoléique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-9 (cis)	Linolénique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-3	Alphalinolénique
Octadécatriénoïque	18 : 3n-6	Gammalinolénique
Eicosatetraénoïque	20 : 4n-6	Arachidonique (AA)
Eicosapentaénoïque (EPA)	20 : 5n-3	Timnodonique
Docosapentaénoïque	22 : 5n-3	Clupanodonique
Docosahexaénoïque (DHA)	22 : 6n-3	Cervonique

Les mécanismes régulant la composition des phospholipides et des acides gras dans l'épididyme demeurent encore inconnus. Cependant, des phospholipases, des enzymes hydrolysant les phospholipides qui seront détaillées dans le chapitre 6, pourraient être impliquées dans le remodelage membranaire. À ce propos, une activité des phospholipases A 1 et A2 a notamment été détectée dans les spermatozoïdes épididymaires chez la chèvre. Bien que l'activité enzymatique de ces phospholipases diminue dans les spermatozoïdes au cours du transit épididymaire, il a été démontré que ces enzymes peuvent hydrolyser le PC, le PI, le PE et l'acide phosphatidique (Atreja and Anand, 1985). Le niveau de cholestérol subit aussi des variations au cours du transit épididymaire des spermatozoïdes. Chez plusieurs espèces telles que le bœuf (Parks and Hammerstedt, 1985), le bovidé (Poulos et al., 1973), la souris (Rejraji et al., 2006) et le rat (Hall et al., 1991) le niveau de cholestérol des spermatozoïdes diminue au cours du transit. Cette diminution en cholestérol n'est toutefois pas observée chez toutes les espèces. Chez la chèvre, le niveau de cholestérol des spermatozoïdes augmente de façon considérable (66%) entre la tête et la queue de l'épididyme (Rana et al., 1991) tandis que chez le ver, le niveau de cholestérol ne subit pas de variation significative (Nikolopoulou et al., 1985). Il y a 26 fois plus de cholestérol présent dans les membranes spermatisées que dans les membranes des cellules somatiques. À titre d'exemple, chez la souris, la quantité de cholestérol dans la membrane plasmique des spermatozoïdes décroît d'environ 65 % au cours de la maturation épididymaire (Rejraji et al., 2006). Le cholestérol en présence de glycérophospholipide et de sphingomyéline a tendance à former des radeaux lipidiques qui limitent la diffusion des lipides (Martinez-Garcia et al., 1995) et contribue à rigidifier la membrane (Schroeder et al., 1991).

La proportion de phospholipides insaturés de même que le niveau de cholestérol sont des caractéristiques déterminant la fluidité membranaire. Ainsi, une augmentation de la proportion de phospholipides insaturés et une baisse de cholestérol mène à une augmentation de la fluidité des membranes des spermatozoïdes. Une plus grande fluidité membranaire est essentielle pour la fusion des membranes lors de la fécondation. Deux mécanismes, l'entrée

de bicarbonate dans le spermatozoïde et l'efflux de cholestérol, entraînent des modifications majeures de la composition de la membrane plasmique du spermatozoïde.

A noter que ces analyses ne permettent donc qu'une observation limitée de l'évolution membranaire et lipidique du spermatozoïde, et de nombreuses équipes préfèrent encore travailler sur des spermatozoïdes entiers. C'est pourquoi, l'essentiel de ce qui est rapporté ci-dessus concerne des évaluations de composition lipidique spermatique réalisées sur des spermatozoïdes entiers.

Après le stockage des spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes vont être mélangés avec des sécrétions issues des glandes annexes (vésicule séminale et la prostate) lors d'éjaculation puis si l'éjaculation est intra-vaginale, ils pourront commencer leur course pour rencontrer l'ovocyte et le féconder.

### ***2.3. Rôle des glandes annexes sur les spermatozoïdes***

Pour la plupart des espèces de mammifères, aucun rôle précis ne peut être attribué aux glandes annexes puisqu'il n'y a pas de différence notable de taux de fécondation entre les spermatozoïdes prélevés dans la queue de l'épididyme et ceux éjaculés (Amann and Griel, 1974; Cooper, 2007). Il est même nécessaire d'éliminer le plasma séminal pour maximiser la fécondation *in vitro* (Mortimer, 1994). En effet, le plasma séminal contient des protéines qui peuvent affecter la motilité ou la survie des spermatozoïdes *in vitro*. Ces facteurs ont été rapportés dans le plasma séminal de différents mammifères incluant le porc (Iwamoto et al., 1992; Jeng et al., 1993), le taureau (al-Somai et al., 1994), et la souris (Peitz, 1988). Chez l'homme, le facteur inhibant la mobilité des spermatozoïdes est un fragment actif de la sémenogéline, une protéine de 52 kDa produite par les vésicules séminales et impliquée dans la coagulation du sperme après éjaculation (Robert and Gagnon, 1996). La sémenogéline est rapidement dégradée par une protéase de la prostate, la prostate-specific antigen ou PSA, conduisant à la liquéfaction du sperme et l'initiation de la motilité. La sémenogéline et les produits dérivés de sa dégradation semblent jouer un rôle important dans la prévention de la capacitation prématurée des spermatozoïdes et de la fécondation (de Lamirande, 2007).

Le plasma séminal semble toutefois être un composant essentiel lors de l'accouplement naturel car il servirait de transporteur et de protecteur des spermatozoïdes (Murer et al., 2001; Peitz and Olds-Clarke, 1986). Les rôles principaux du plasma séminal chez la souris seraient d'assurer la survie des spermatozoïdes lors de leur ascension vers les ovocytes (Peitz and Olds-Clarke, 1986) ou dans la formation du bouchon copulatoire (Murer et al., 2001). Chez les rongeurs, la prostate et les vésicules séminales produisent des facteurs composant le plasma séminal qui protègent et nourrissent les spermatozoïdes en leur procurant des molécules source d'énergie pour le métabolisme mitochondrial et donc la mobilité des gamètes dans le tractus génital femelle. L'ablation chirurgicale bilatérale des vésicules séminales réduit significativement le pouvoir fécondant des souris, démontrant ainsi le rôle du plasma séminal dans la fertilité chez ces rongeurs (Pang et al., 1979). Dans un modèle de souris ayant une spermatogenèse mais une action limitée des androgènes dans les organes sexuels annexes, il a été démontré que les spermatozoïdes de souris mâles sont subfertiles. Cette dysfonction serait causée par une accessibilité très réduite des spermatozoïdes aux ovocytes dans le tractus génital femelle à cause des déficiences majeures dans la production et

la composition du plasma séminal ainsi que dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes (Hermo et al., 1994).

Les vésicules séminales, sécrètent des constituants importants pour la mobilité et la survie des spermatozoïdes. Des facteurs comme le folate semblent jouer un rôle important dans le maintien de la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes (Boxmeer et al., 2009). Enfin, des médiateurs immuns et inflammatoires comme le TGF $\beta$  et les prostaglandines seraient impliqués dans la suppression de la réponse immune dans le tractus génital femelle (Robertson, 2007). Les prostaglandines présentes dans le plasma séminal peuvent également modifier les contractions du muscle lisse utérin et faciliter l'ascension des spermatozoïdes à travers l'oviducte (Robertson, 2007).

Le caractère hydrophobe de la double couche lipidique permet à la cellule de maintenir des concentrations de solutés différentes de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire entre cytoplasme et milieu extracellulaire et ceci est vrai pour chaque compartiment cellulaire (mitochondrie, lysosome, réticulum endoplasmique, etc.). La séparation des compartiments définis par la membrane ne doit cependant pas être totale et des échanges moléculaires sont nécessaires à la vie cellulaire. Les spermatozoïdes ont trois types de systèmes de transport ionique : Les Adénosines tri phosphatase (ATPase) membranaire, les échangeurs ioniques et les canaux ioniques. Ces derniers, seront plus particulièrement détaillés, du fait de leur importance considérable dans les processus de signalisation du spermatozoïde.

## *2.4. Conclusion*

La différenciation des gamètes mâles s'effectue dans le testicule. Cependant à leur sortie les spermatozoïdes ne sont pas matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. La différenciation se poursuit en dehors de la gonade, dans le tube épидидymaire et constitue la maturation des spermatozoïdes. Dans cet organe, les spermatozoïdes continuent à se transformer en subissant plusieurs modifications notamment biochimiques, qui les rendront aptes à reconnaître et à féconder un ovocyte.

L'épидидyme est un long canal, composé de trois parties : la tête, le corps, et la queue, ce dernier possède plusieurs fonctions:

- la progression des gamètes par contraction des cellules musculaires.
- la réabsorption de liquides (eau, ions et protéines), essentiellement dans les premières régions épидидymaires, ce qui entraîne une augmentation de la concentration en spermatozoïdes.

- la sécrétion dans la lumière des molécules organiques et d'enzymes permettant de maintenir les gamètes en vie, de stabiliser leur membrane plasmique et de leur conférer leur mobilité et leur fertilité.
- stockage des spermatozoïdes

### ***3. Chapitre 3 : Les systèmes de transport ionique du spermatozoïde***

#### ***3.1. Les ATPase membranaires***

Deux sortes d'ATPases membranaires ont été bien décrites:

La pompe sodium-potassium ou  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est une protéine transmembranaire, localisée dans tous les membranes cytoplasmiques dont l'activité enzymatique utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP en ADP et phosphate inorganique pour transporter des ions potassium et sodium contre leur gradient de concentration. Elle joue un rôle dans la régulation de la capacitation, la réaction acrosomique et la mobilité des spermatozoïdes (Mrsny et al., 1984). La pompe permet d'échanger les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) issus du milieu intracellulaire avec les ions potassium  $\text{K}^+$  issus du milieu extracellulaire dans un rapport précis ( $3 \text{ Na}^+ / 2 \text{ K}^+$ ). Cette pompe est responsable du rétablissement de l'équilibre initial après un potentiel d'action. L'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase provoque la phosphorylation de la tyrosine et la capacitation par de multiples voies de transduction du signal, conférant au spermatozoïde bovin la capacité de féconder (Newton et al., 2010).

L'ATPase calcique, permet l'expulsion de deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (contre son gradient de concentration) par molécule d'ATP dégradée. Les ATPases calciques sont présentes au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde, et sont bien décrit dans la signalisation calcique, régulant la capacitation, la réaction acrosomique ainsi que la mobilité spermatique (Roldan and Fleming, 1989)

#### ***3.2. Les co-transporteurs***

Le transport des molécules contre leur gradient électrochimique ne nécessite pas forcément l'hydrolyse de l'ATP. Il existe de nombreux cas où l'énergie est fournie par un ion ou une autre molécule qui suit son gradient électrochimique. Ce phénomène s'appelle transport couplé ou co-transport, car il couple un canal ionique à une pompe membranaire et utilise l'énergie de l'un pour activer l'autre. Ces transports couplés sont très utilisés par la cellule pour récupérer les molécules nécessaires à son métabolisme dans le milieu extérieur. Parmi les nombreux co-transporteurs connus, quatre sont importants dans la physiologie spermatique :

L'échangeur sodium/proton NHE ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger) assurant la régulation du pH interne, entre 7.0 et 7.4. la régulation du pH interne est indispensable à un déroulement correct des voies de signalisation de la physiologie spermatique (Pholpramool et al., 2011), comme la mobilité spermatique et la fécondation (Wang et al., 2003).

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), est présent au niveau du spermatozoïde et permet le maintien de l'homéostasie calcique ainsi que la régulation de la mobilité spermatique chez l'homme (Krasznai et al., 2006).

L'échangeur chlore/bicarbonates ( $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ), permet une augmentation intracellulaire de l'anion bicarbonate, qui contribue à la dernière étape de maturation de spermatozoïde (la capacitation) juste avant de féconder un ovocyte mature. (Chavez et al., 2012)

L'échangeur sodium/potassium/chlore ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ ) NKCC joue un rôle très important dans la maturation des spermatozoïdes (voir chapitre 4 : la capacitation) (Wertheimer et al., 2008)

### *3.3. Les canaux ioniques*

#### *3.3.1. Les canaux sodiques*

Deux types de canaux sodiques sont actuellement bien décrits, des canaux sodiques activés par une dépolarisation de la membrane ( $\text{Nav.x}$ ) et des canaux sodiques couplés aux protéines G.

L'équipe de Cejudo-Roman (Cejudo-Roman et al., 2013) a montré la présence des canaux sodiques dépendant du voltage  $\text{Nav1.8}$  au niveau des spermatozoïdes humains. Cette équipe a montré aussi un rôle de ces canaux dans la régulation de la mobilité spermatique, puisque l'application de veratridine, un activateur des canaux  $\text{Nav}$ , sur les spermatozoïdes induit une augmentation de leur mobilité.

#### *3.3.2. Les canaux potassiques*

Les canaux potassiques participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables du maintien du potentiel transmembranaire. Ces canaux sont des protéines transmembranaires, ils transportent spécifiquement les ions potassium ( $\text{K}^+$ ). Le contrôle et la modulation de l'activité de ces canaux ioniques est réalisé par la variation du potentiel transmembranaire, par action de messagers intracellulaires tels l' $\text{IP}_3$ , le DAG ou les protéines G, ainsi que par diverses substances telles que le calcium ou le magnésium. Cette activité peut être couplée à des récepteurs membranaires soit directement, soit via des messagers intracellulaires. Les canaux  $\text{K}^+$  sont localisés au niveau de la pièce principale du flagelle ainsi qu'au niveau de la tête du spermatozoïde. Ces canaux potassiques permettent la diffusion passive et sélective des ions  $\text{K}^+$  à travers la membrane plasmique. Ils peuvent ainsi se différencier en plusieurs catégories : ceux dépendants du voltage ( $\text{Kv1.1}$ ,  $\text{Kv1.2}$ ,  $\text{Kv3.1}$ ,  $\text{Ksper}$ ,  $\text{Slo3}$ ), ceux sensibles au calcium, ceux couplés à une protéine G (GIRK) mais encore ceux sensibles à l'ATP. Ils contrôlent le potentiel de membrane, paramètre important de la mobilité. Par exemple :  $\text{Slo1}$  est le principal canal potassique de spermatozoïde humain (Mannowetz et al., 2013) . $\text{SLO3}$  est présent chez la souris, il joue un rôle dans

l'hyperpolarisation de la membrane plasmique de spermatozoïdes comme la capacitation (Chavez et al., 2013)

### *3.3.3. Les canaux chlorures*

Un flux net d'ions à travers une membrane génère un potentiel électrique. De ce fait, le déséquilibre des concentrations ioniques se traduit par une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. Au repos, le potentiel de membrane,  $V_m$ , est la résultante des différentes conductances membranaires aux anions et cations. Dans la plupart des cellules, la conductance dominante au repos est la conductance aux ions potassium. Par conséquent, le potentiel de repos de nombreuses cellules est proche du potentiel d'équilibre des ions potassium. L'ouverture d'une conductance aux ions chlorure va déplacer le potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre des ions chlorure, c'est à dire dépolariser la membrane. Par contre, si la membrane est dépolarisée (généralement par un flux entrant d'ions sodium ou calcium), alors une augmentation de la conductance aux ions chlorure aura un effet hyperpolarisant (ou repolarisant). Dans tous les cas, l'ouverture des canaux chlorure aura pour effet de stabiliser le potentiel de membrane près du potentiel d'équilibre des ions chlorure, qui n'est généralement pas très différent du potentiel de repos. De manière générale, les canaux chlorure interviennent donc dans le contrôle du potentiel de membrane et de l'excitabilité membranaire.

Trois types de canaux chlorures sont plus étudiés et retrouvés au niveau des spermatozoïdes:

- Les canaux  $\text{Cl}^-$  couplés au récepteur  $\text{GABA}_a$ , dont l'activation entraîne une hyperpolarisation de la membrane et qui jouent un rôle dans la mobilité spermatique et la capacitation (Jin et al., 2009).
- Les canaux  $\text{Cl}^-$  couplés à un récepteur glycine qui ont un rôle dans la mobilité des spermatozoïdes (Santi et al., 2013)
- Les canaux  $\text{Cl}^-$  dépendants du voltage. Ils participent au contrôle du potentiel de membrane ainsi que dans la réaction acrosomique, la capacitation et la fécondation (Li et al., 2013).

Les canaux SLC26 (Solute Linked Carrier 26) sont des protéines membranaires assurant le transport d'anions monovalents ou bivalents tels que le chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ).

Chez la souris La mutation de ces canaux induit une absence de mobilité des spermatozoïdes (asthénozoospermie totale) (Rode et al 2011), un défaut de capacitation et des anomalies structurales du flagelle

Le canal anionique CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) est exprimé dans le spermatozoïde et sa contribution dans l'entrée des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  au cours de la capacitation a récemment été montrée (Rode et al 2011). En plus SLC26 interagit physiquement avec CFTR et stimule fortement son activité de transport.

### *3.3.4. Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques (canaux CNG)*

Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques sont des canaux ioniques non sélectifs, qui sont activés par des nucléotides cycliques tels que l' $\text{AMP}_c$  et le  $\text{GMP}_c$ . Des études d'immunohistochimie ont montré la présence des canaux CNG au niveau du flagelle des spermatozoïdes (Cisneros-Mejorado and Sanchez, 2011). En effet, des études montrent que le 8-BrcGMP (8- Bromoguanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate) induit d'une part la réaction acrosomique (Cisneros-Mejorado and Sanchez Herrera, 2012) et d'autre part une vague calcique au niveau de la tête des spermatozoïdes. Cependant, l'invalidation du gène GNCA3 n'induit aucune infertilité spermatique. Les canaux CNG jouent un rôle dans la capacitation (Cisneros-Mejorado et al., 2014) et le chimiotactisme entre les gamètes (Strunker et al., 2006).

### *3.4.Diversité des canaux calciques présents au niveau du spermatozoïde*

La signalisation calcique s'effectue via des augmentations de la concentration du calcium et nécessite le transfert du calcium des espaces intra et extracellulaires de stockage vers le cytoplasme, par l'intermédiaire de canaux calciques. Il existe différents types de canaux qui se différencient par leur stimulus d'activation et leur localisation cellulaire.

L'ouverture de ces canaux peut être due soit à la liaison d'un ligand spécifique directement sur le canal possédant un récepteur ou sur une protéine couplée au canal, soit par un changement de potentiel de la membrane pour les canaux voltages dépendants. Il a ainsi été décrit au niveau des spermatozoïdes 3 types de canaux calciques.

#### *3.4.1. Les canaux calciques dépendant du potentiel :*

Ces canaux calciques sont activés par une dépolarisation de la membrane. Ils sont classés en fonction de leurs caractéristiques biophysiques, pharmacologiques et phylogéniques. Ainsi six



canaux ont été identifiés et regroupés en deux familles. Les canaux HVA (High Voltage-Activated) qui sont activés par de fortes dépolarisations membranaires de -90 à 0 mV. Ces canaux appartiennent aux sous-familles Cav1.x et Cav2.x Les Canaux LVA (Low Voltage-Activated) qui sont activés par de faibles dépolarisations membranaires de -90 à -50 mV. Ces canaux sont de type T (Transient), ils sont caractérisés par un courant transitoire qui s'inactive avec des constantes de temps de l'ordre de 10 à 50 ms. Ces canaux appartiennent aux sous-familles Cav3x. Au niveau des spermatozoïdes, des membres de ces deux familles sont présents (Cav1.2, 2.2, 3.1, 3.2) (Escoffier et al., 2007). Ils sont essentiellement impliqués dans la réponse calcique au cours de la réaction acrosomique et du mouvement flagellaire. Le canal CatSper est un canal calcique essentiel à la mobilité du spermatozoïde (Ren et al., 2001). Sa structure est similaire à celle des canaux potassique et forme un pore constitué de 4 sous-unités différentes (CatSper 1-4), chacune comportant 6 segments transmembranaires (Qi et al., 2007). Au moins 2 sous-unités accessoires (CatSper  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont liées à ce canal et sont nécessaires à son fonctionnement (Chung et al., 2011). Ce canal est dépendant du voltage et est fortement activé par une alcalinisation intracellulaire. Il est localisé dans la pièce principale du flagelle du spermatozoïde et est responsable de l'hyperactivation nécessaire à la traversée de la zone pellucide (ZP). Des souris *knock out* déficientes pour n'importe quelle sous-unité du canal CatSper sont totalement stériles car leurs spermatozoïdes sont incapables de traverser la ZP. Grâce à la technique de *patch clamp*, les courants ioniques traversant la membrane plasmique du spermatozoïde peuvent être mesurés, et plus particulièrement les courants portés par l'ouverture du canal CatSper. L'ouverture du canal CatSper peut également être objectivée par la mesure de la concentration du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) interne par l'intermédiaire de sondes fluorescentes spécifiques au  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.4.2. Les canaux de type SOC « Store Operated Channels »

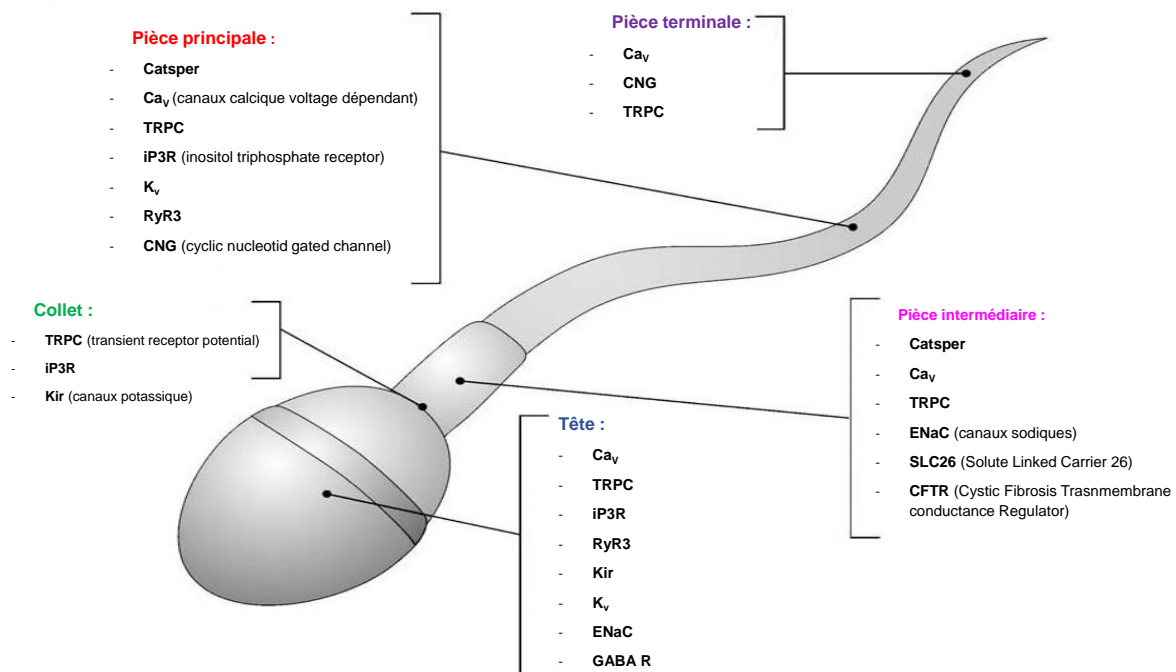
Les canaux SOC sont activés par la vidange des stocks calciques intracellulaires, les TRP (Transient Receptor Protein) sont leurs principaux représentants. Ils permettent une entrée importante de calcium lorsque des signalisations calciques soutenues sont nécessaires et fournissent le calcium pour remplir à nouveau les stocks calciques intracellulaires. Plusieurs membres des TRP ont été décrits dans le spermatozoïde (Jungnickel et al., 2001). Les canaux TRPC2 sont impliqués dans la réaction acrosomique. D'autres, comme TRPC1 ou TRPC3, ont des rôles encore mal compris (Stamboulion et al., 2005). L'activation des SOC qui fait suite à la vidange des stocks calciques intracellulaires. Il est important de noter que l'activité des TRPs peut être modulée par des médiateurs lipidiques.

### 3.4.3. Les canaux calciques du réticulum (iP3R, Ryanodine RyR)

L'IP3R est un canal de la membrane intracellulaire activé par la liaison de l'Inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 est un messenger secondaire. Il s'agit du produit de la dégradation du phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) par la phospholipase C (PLC) en réponse à la stimulation d'un récepteur couplé aux protéines G ou d'un récepteur aux tyrosines kinases qui est responsable du relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks internes. Au niveau du spermatozoïde, on le retrouve majoritairement au niveau de la vésicule acrosomique (Walensky and Snyder, 1995).

### Conclusion :

Le spermatozoïde de mammifères est une cellule très complexe, équipé de nombreux systèmes de transport ionique, similaires à ceux présents dans les cellules somatiques. Les canaux ioniques qui ont été détaillés dans ce chapitre, du faite de leur importance considérable dans les différents mécanismes physiologiques et intracellulaires comme la capacitation et la réaction acrosomique (qui seront détaillés dans les chapitres 4 et 5), ces mécanismes vont permettre au spermatozoïde de féconder un ovocyte. Dans **la figure 8** vous trouvez en résumé la distribution des différents canaux ioniques dans le spermatozoïde. Dans le chapitre suivant qui décrit la capacitation on va valoriser les fonctions de ces canaux afin de mieux comprendre la capacitation qui est une étape de maturation des spermatozoïdes.



**Figure 8:** Représentation schématique de la distribution des canaux ioniques dans le spermatozoïde de mammifères (Darszon et al 2005) modifiée.

#### ***4. Chapitre 4 : La capacitation, étape de maturation des spermatozoïdes***

Les spermatozoïdes éjaculés sont spontanément incapables de féconder l'ovocyte. La capacitation correspond à l'ensemble des modifications physiologiques post éjaculation qui va permettre au spermatozoïde d'acquérir son pouvoir fécondant, lors de son ascension dans le tractus génital femelle. C'est donc une étape de maturation indispensable à la fécondation. Elle est réversible : les spermatozoïdes capités peuvent être « décapités » (Bi et al., 2009) s'ils sont incubés dans le plasma séminal. La totalité des processus qui rentrent en jeu dans ce phénomène n'est pas connue, mais certains mécanismes ont été décryptés. Ils sont ici rassemblés en 4 grandes parties :

- Des modifications membranaires avec des réorganisations de phospholipides accompagnées d'un efflux de cholestérol induit par l'albumine et les lipoprotéines présentes dans le tractus génital femelle (Gadella et al., 2008; Lin and Kan, 1996) ;
- Des modifications ioniques intracellulaires et membranaires avec hyperpolarisation de la membrane plasmique, augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et augmentation du pH interne (Arnoult et al., 1999) ;
- Un réarrangement des protéines de la membrane plasmique accompagné de phosphorylations des protéines qui permettent la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide et de certaines protéines impliquées dans l'exocytose de la vésicule acrosomiale;
- Une hyperactivation flagellaire (Navarro et al., 2008) .

#### *4.1.Modification de la composition lipidique membranaire lors de la capacitation*

Lors de la capacitation, la membrane plasmique du spermatozoïde subit des modifications et notamment des modifications lipidiques. Ces dernières correspondent à des changements dans la distribution et la composition en lipides et phospholipides, ce qui conduit à une augmentation de la fluidité membranaire et à des changements de l'architecture et de la composition de la membrane.

##### *4.1.1. La membrane plasmique du spermatozoïde avant capacitation*

La composition lipidique des membranes des spermatozoïdes avant la capacitation lors de la maturation épидидymaire est inhabituelle par rapport à celle des autres somatiques de mammifères en présentant notamment :

- Un taux élevé de cholestérol, distribué uniformément au niveau des zones membranaires apicales et équatoriales de la tête du spermatozoïde.
- Des glycérophospholipides essentiellement sous forme de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) mais aussi de plasmalogènes (choline et éthanolamine).
- De la sphingomyéline en quantité importante.
- Un rapport cholestérol/phospholipides élevé équivalent à 1.
- Une quantité importante d'acides gras polyinsaturés fixés aux phospholipides.

Chez l'homme, la quantité de lipides membranaires du sperme varie considérablement d'un individu à un autre. La présence, d'une part, d'un taux élevé de cholestérol et de glycérophospholipides contribuant à former des régions membranaires non-diffusibles et,

d'autre part, de la sphingomyéline interagissant avec le cholestérol, conduit à rigidifier et à stabiliser la membrane. La fluidité membranaire (notamment la mobilité des phospholipides dans la bicouche) est limitée tout comme la perméabilité membranaire aux ions ou encore l'insertion de protéines. La diffusion limitée des phospholipides conduit à une membrane asymétrique : les aminophospholipides (phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine) sont localisés de façon prépondérante dans le feuillet interne (cytosolique) de la bicouche lipidique alors que les phospholipides neutres (phosphatidylcholine et sphingomyéline) sont davantage présents dans le feuillet externe. Une large proportion de lipides peut cependant diffuser latéralement dans la membrane.

Il existe également dans la membrane des spermatozoïdes des régions particulières ou microdomaines appelées « lipid rafts », riches notamment en sphingolipides, en phospholipides à longues chaînes saturées et en cholestérol, mais aussi en protéines spécifiques (cavéoline-1 par exemple).

## *4.2. La membrane plasmique du spermatozoïde lors de la capacitation*

La capacitation du spermatozoïde est associée à une diffusion augmentée des lipides au niveau de la membrane de l'acrosome, de la pièce intermédiaire et du flagelle. En revanche, cette diffusion est diminuée au niveau de la membrane de la région post-acrosomale du spermatozoïde.

### *4.2.1. Efflux de cholestérol*

Bien que la séquence chronologique exacte des modifications membranaires ne soit pas encore clairement établie, plusieurs évidences suggèrent que l'efflux de cholestérol de la membrane plasmique est requis pour l'initiation de la capacitation (Flesch and Gadella, 2000; Visconti et al., 1995). L'albumine présente dans les fluides tubaires et folliculaires stimule la capacitation et sa présence dans le milieu d'incubation est requise pour la capacitation des spermatozoïdes de nombreuses espèces de mammifères *in vitro*. L'efflux de cholestérol constitue une des étapes essentielles dans l'initiation de la capacitation et nécessite dans des études *in vitro* la présence d'accepteurs de cholestérol comme l'albumine (connue pour éliminer notamment le cholestérol) (**Figure 9**) ou des lipoprotéines. Parmi ces dernières présentes dans les liquides folliculaires ou de l'oviducte (notamment humains et bovins), c'est plus spécifiquement les HDL qui captent le cholestérol.

Il a également été montré que la présence de protéines liant les lipides comme les protéines de type « bovine séminal plasma » (BSP) présentes en quantité abondante dans le plasma séminal bovin et humain induisait un efflux de cholestérol et la capacitation. De plus, chez les bovins, les protéines BSP pourraient être associées à des HDL du liquide folliculaire et donc avoir un effet synergique dans la capacitation. Par ailleurs, un transporteur de stérol (ressemblant au scavenger receptor de type 1, SRB-1) et l'activation d'une sphingomyélinase seraient également impliqués dans l'efflux de cholestérol.

Récemment une nouvelle publication (Watanabe et al., 2014) montre l'effet d'une molécule Lipocaline2 (Lcn2) (Lcn2 est une molécule connue comme un facteur immunitaire inné qui inhibe la croissance bactérienne) qui induit la maturation des spermatozoïdes en se fixant sur les PE de la membrane plasmique, ce qui permet la réorganisation des micro-domaines (lipid raft) via un mécanisme PKA-dépendant, tout en facilitant l'efflux du cholestérol. Ceci nous montre deux voies différentes de signalisation pour induire la capacitation : albumine-dépendant et lipocaline-dépendant.

#### 4.2.2. Redistribution du cholestérol

L'augmentation de la fluidité membranaire induite par l'efflux de cholestérol permet la diffusion latérale du cholestérol restant et donc sa redistribution. Ce dernier se retrouve concentré uniquement dans la zone apicale ou partie antérieure de la tête lors de la capacitation. C'est également dans cette zone que l'on observe une perte de l'asymétrie des phospholipides due à leur réorganisation (Fig.9)

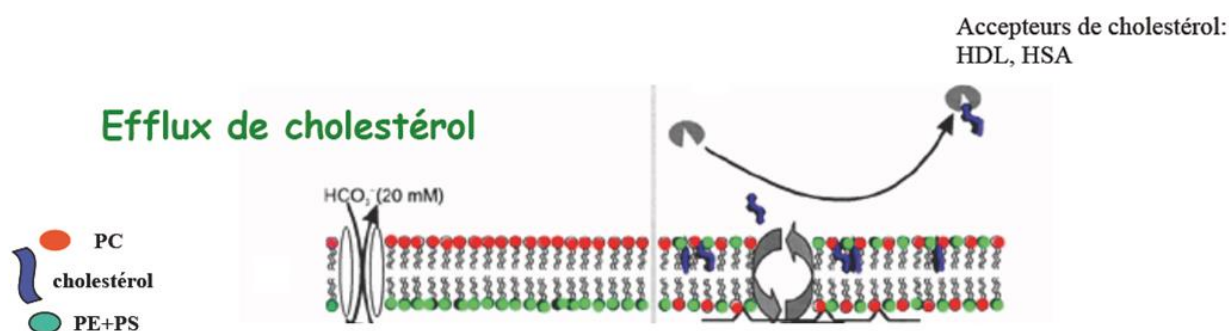


Figure 9 : Redistribution du cholestérol

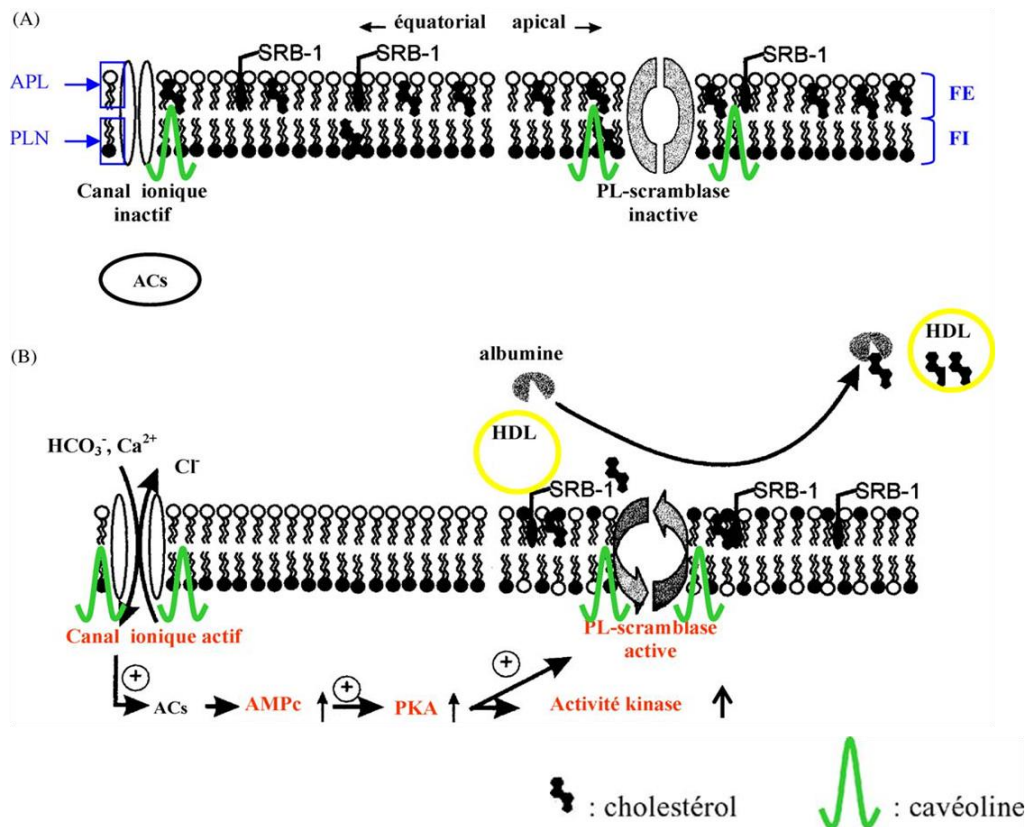
#### 4.2.3. Réorganisation des phospholipides

Elle a été particulièrement bien étudiée chez le verrat. Faisant suite à l'efflux de cholestérol, l'asymétrie des phospholipides membranaires est perturbée dans la partie antérieure de la tête. La perte de cholestérol provoque une interaction entre les cavéolines-1 et les protéines de translocation de phospholipides appelées scramblases, ce qui conduit à leur activation et au passage des phospholipides d'un feuillet à un autre (« flip-flop » membranaire ou scramble).

Par ailleurs, le bicarbonate présent à forte concentration dans un milieu capacitant induit une translocation de phosphatidylcholine et de sphingolipides du feuillet externe au feuillet interne sans doute via l'activation des scramblases. La capacitation est également associée à

l'augmentation de la méthylation des phospholipides et à l'origine d'une synthèse accrue de phosphatidylcholine à partir de phosphatidyléthanolamine.

L'efflux de cholestérol, conduit donc à la baisse du rapport cholestérol/phospholipides membranaire et augmente ainsi la fluidité de la membrane. Les changements de propriété de la membrane plasmique dans la zone antérieure de la tête du spermatozoïde vont ainsi affecter directement la redistribution des protéines et notamment de la cavéoline-1 et de la flotilline-1 (Travis and Kopf, 2002) suite à la modification de structure des « lipid rafts » (**Fig.10**) permettant ainsi la redistribution des phospholipides, ce qui favoriserait alors l'interaction de molécules de signalisation. Ces changements font aussi apparaître des zones membranaires fusiogènes et permettent l'externalisation de récepteurs spermatiques susceptibles d'intervenir dans la liaison avec la zone pellucide de l'ovocyte. Les changements de propriété de la membrane plasmique sont aussi responsables de modifications de l'activité des canaux ioniques ou d'échangeurs d'ions augmentant ainsi la perméabilité de la membrane aux ions dont les ions bicarbonates et calciques. Toutes ces étapes sont indispensables à l'hyperactivation transitoire du spermatozoïde et à la réalisation de la réaction acrosomique.



**Figure 10 :** Organisation des lipides et phospholipides de la membrane plasmique en conditions non capacitantes (A) et capacitantes (B) . ACs : adénylate cyclase soluble ; APL : Aminophospholipides (PL) ; FE : feuillet externe ; FI : feuillet interne ; HDL : high density lipoprotein ; PLN : PL neutrals ; SRB-1 : scavenger receptor de type B et de classe 1 (Travis and Kopf, 2002) modifiée .



#### *4.3. Le bicarbonate induit des modifications lipidiques de la membrane*

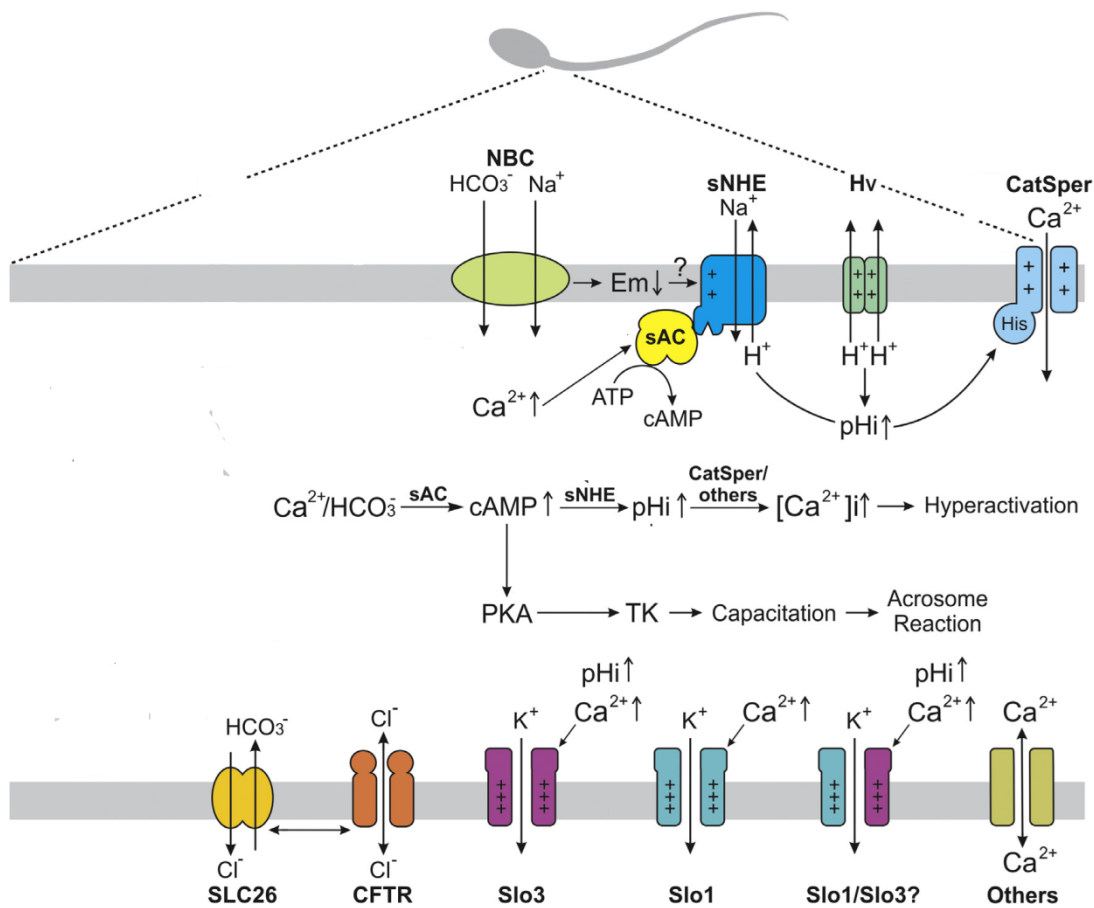
La capacitation des spermatozoïdes est aussi associée à une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Chez la souris, le potentiel électrique membranaire oscille entre -35 et -45 mV avant la capacitation pour atteindre environ -70 mV pendant la capacitation (Arnoult et al., 1999; Demarco et al., 2003). La régulation du potentiel membranaire résulte en partie du mouvement de certains ions dont le potassium ( $K^+$ ), le sodium ( $Na^+$ ), l'hydrogène ( $H^+$ ), le chlore ( $Cl^-$ ) et le bicarbonate ( $HCO_3^-$ ). L'influx de  $HCO_3^-$  contribue à l'alcalinisation du pH intracellulaire ainsi qu'à l'hyperpolarisation de la membrane et s'effectue possiblement par transport actif via un Co-transporteur  $HCO_3^-/Na^+$  (Demarco et al., 2003). L'entrée de  $HCO_3^-$  dans le spermatozoïde est dépendante de la présence de  $Cl^-$  dans le milieu extracellulaire (Chen et al., 2000). L'entrée de  $HCO_3^-$  est également associée à des modifications membranaires observées au niveau de la tête et potentiellement médiées par l'activation d'une scramblase qui favoriserait la redistribution du cholestérol (Flesch et al., 2001; Gadella and Harrison, 2000). La régulation du  $K^+$  par des canaux ioniques spécifiques aux spermatozoïdes contribue également à l'hyperpolarisation de la membrane (Martinez-Lopez et al., 2009; Santi et al., 2010; Zeng et al., 1995). La délétion du gène *Slo3*, codant pour le canal *Ksper*, conduit à la dépolarisation de la membrane plasmique, l'altération des paramètres de motilité et l'incapacité des spermatozoïdes à subir la réaction de l'acrosome (Santi et al., 2010; Zeng et al., 2011). Ce phénotype mène à l'infertilité des souris mâles et suggère que *Ksper* est le principal canal potassique des spermatozoïdes. Les changements physico-chimiques que subissent les membranes des spermatozoïdes lors de la capacitation jouent deux rôles majeurs. Dans un premier temps, le transport des différents ions à travers la membrane plasmique régule le potentiel membranaire et le pH intracellulaire en plus de participer à la transduction de signaux intracellulaires. En second lieu, la réorganisation spatiale des lipides et protéines membranaires favorise la liaison à l'ovocyte et améliore le potentiel fusiogénique des membranes plasmique et externe de l'acrosome. En résumé, les modifications membranaires initient la capacitation et préparent le spermatozoïde à subir la réaction de l'acrosome, une étape indispensable pour le succès de la fécondation naturelle.

#### *4.4. Les différents ions*

L'efflux de cholestérol de la membrane plasmique est préalable à l'alcalinisation du pH intracellulaire (Cross and Razy-Faulkner, 1997), qui résulte principalement de l'entrée massive de l'anion  $HCO_3^-$  dans le spermatozoïde (Demarco et al., 2003; Zeng et al., 1996) et de la sortie des cations  $H^+$  (Lishko et al., 2010). La capacitation est un processus dépendant du  $HCO_3^-$ . Cet ion est très abondant dans les voies génitales femelles et sa présence dans le milieu d'incubation est nécessaire pour induire la capacitation des spermatozoïdes *in vitro*. L'entrée de  $HCO_3^-$  dans la cellule est directement responsable de l'activation d'une adénylate cyclase soluble (SACY) spécifique aux spermatozoïdes (Buck et al., 1999; Chen et al., 2000) et conduit à une augmentation rapide de la concentration d'AMPc intracellulaire (Chen et al.,



2000) En absence de  $\text{HCO}_3^-$ , la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  augmente l'activité de SACY de manière concentration-dépendante (Jaiswal and Conti, 2003). De plus, la contribution majeure des SACYs à l'augmentation de la concentration d'AMPc est soutenue par l'inhibition de l'activité des phosphodiesterases (PDEs), enzymes qui dégradent l'AMPc en 5'-AMP, tout au long du processus de capacitation (Lefievre et al., 2000). La deletion du gène codant pour SACY inhibe complètement la mobilité des spermatozoïdes, laquelle est réactivée par l'ajout d'AMPc dans le milieu d'incubation (Esposito et al., 2004). SACY apparaît donc comme la principale source d'AMPc dans les spermatozoïdes de mammifères et la voie dépendante de l'AMPc joue un rôle clé dans l'augmentation du contenu en phosphotyrosine de protéines spécifiques lors de la capacitation (Galantino-Homer et al., 1997; Visconti et al., 1995) (**Fig 11**).

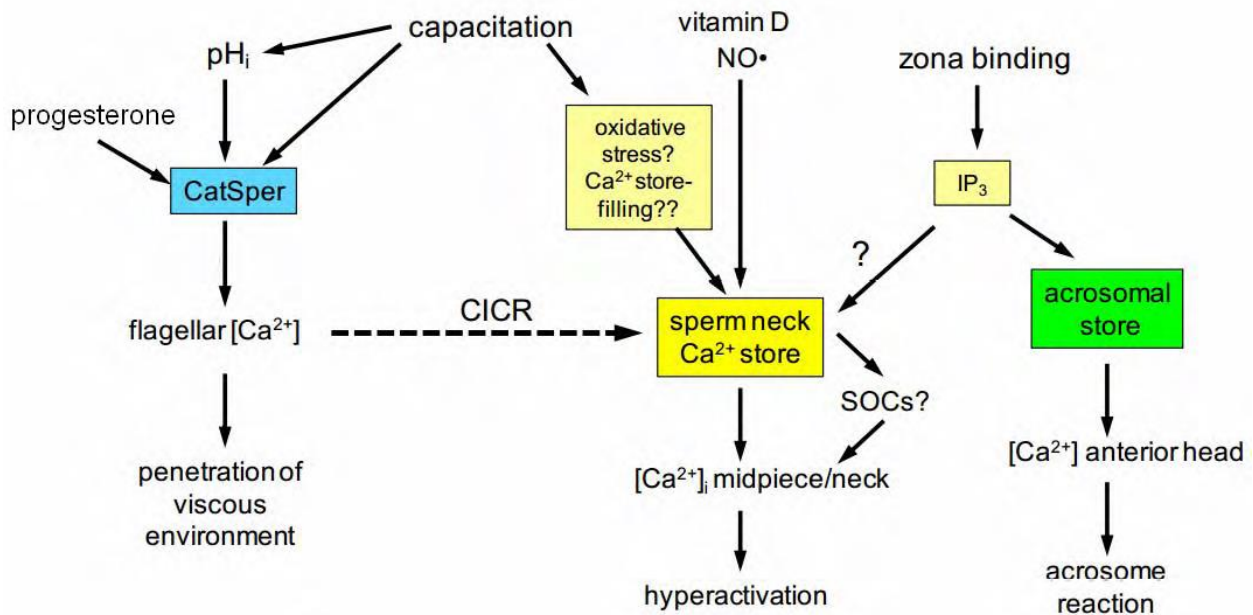


**Figure 11:** Schéma montrant les différentes Modifications ioniques lors de la capacitation des spermatozoïdes de mammifères (Nishigaki et al., 2014)

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager très important et une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ( $[\text{Ca}]_i$ ) est observée lors de la capacitation. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est élevée dans la région du flagelle suite au développement d'une mobilité hyperactive et de façon plus importante dans la tête suite à la réaction acrosomiale (Suarez et al., 1993). La  $[\text{Ca}]_i$  peut être augmentée par l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via des canaux calciques ou la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans des réservoirs intracellulaires. L'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le spermatozoïde est effectuée par différents transporteurs, dont l'expression est compartimentalisée sur le spermatozoïde

(Darszon et al., 2011; Publicover et al., 2007). Les deux principaux types de canaux calciques détectés sur la membrane recouvrant la tête sont les voltage-operated Calcium channels (VOCCs) et les transient receptor potential channel (TRPCs) tandis que sur le flagelle sont présents les Calcium-transient channel of spermatozoa (CatSpers) (**Fig 12**) et les cyclic nucleotide-gated channels (CNGs). Compte tenu du rôle clé joué par l'AMPc dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. De leur côté, les protéines CatSper1-4 exprimées sur la pièce principale du flagelle sont indispensables à la fertilité des gamètes mâles (Jin et al., 2007). Puisque la délétion de l'un ou l'autre des quatre gènes Catsper produit des phénotypes très semblables et que les protéines interagissent entre elles, la formation d'un canal tétramérique est fort probable. Pour le maintien de l'homéostasie, le  $\text{Ca}^{2+}$  est expulsé de la cellule principalement par les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de la membrane plasmique ainsi que par des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCXs) situés sur la pièce intermédiaire et l'acrosome (Krasznai et al., 2006). En plus de l'influx en provenance du milieu extracellulaire, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  peut être augmentée par la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé dans des réservoirs intracellulaires. Les spermatozoïdes possèdent des réservoirs de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la tête et de la partie proximale du flagelle.

La présence de molécules impliquées dans l'accumulation et le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  a mis en évidence que la vésicule acrosomale est un réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$ . La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans les réservoirs résulte principalement de l'activation du récepteur de l'inositol-3, 4, 5-phosphate (IP3R). Ce dernier est exprimé dans la région acrosomale et perdu suite à l'exocytose de l'acrosome (Kuroda et al., 1999). L'IP3R est également détecté dans la région du cou. De plus, la présence du récepteur dépendant de la Ryanodine (RyR) (**Fig 12**) dans cette région ajoutée à celle de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la voie sécrétrice (SPCA) 1 sur toute la longueur de la pièce intermédiaire soutiennent l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  par un ou plusieurs réservoirs dans la portion proximale du flagelle (Harper et al., 2004). Un réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$  autre que celui formé par les mitochondries est présent à la base du flagelle, plus précisément dans la membrane nucléaire redondante, et participe à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  en direction de l'axonème (Ho and Suarez, 2003). La régulation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  joue un rôle primordial dans l'acquisition du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. L'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu d'incubation compromet la mobilité des spermatozoïdes ainsi que l'exocytose de l'acrosome, deux éléments indispensables à la fertilité des spermatozoïdes in vivo.



**Figure 12:** Modèle de l'interaction des entrées de calcium médiés par CatSper (carré bleu) et des relâchements des stocks interne de calcium situés dans la région du cou (carré jaune). Les stocks internes de calcium sont aussi représentés (carré vert). CatSper est permet une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  qui induit le relâchement de  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) des stocks internes. La voies de signalisation pour mobiliser les stocks internes de calcium pourraient passer par les canaux SOCs. La flèche en gris montre la mobilisation possible des stocks calciques du cou par la progestérone indépendamment des canaux CatSper (Alasmari et al., 2013) modifié.

L'extrusion des ions  $\text{H}^+$  contribue à la hausse du pH intracellulaire et possiblement à l'activation des CatSper. La sortie des ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  contribue également de façon significative au processus de capacitation (Fig 12). La baisse de motilité observée suite à l'incubation des spermatozoïdes dans un milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{2+}$  serait causée par l'influx de  $\text{Na}^+$  (Torres-Flores et al., 2011). En accord avec ces résultats, une diminution de la  $[\text{Na}^+]_i$  est rapportée lors de la capacitation (Escoffier et al., 2012). De son côté, l'extrusion du  $\text{K}^+$  principalement via le canal Ksper favorise l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, laquelle est indispensable pour l'exocytose de la vésicule acrosomale (Santi et al., 2010).

Les milieux de culture utilisés pour la capacitation des spermatozoïdes *in vitro* contiennent tous les ions mentionnés ci-dessus. En plus de l'albumine et des substrats énergétiques.

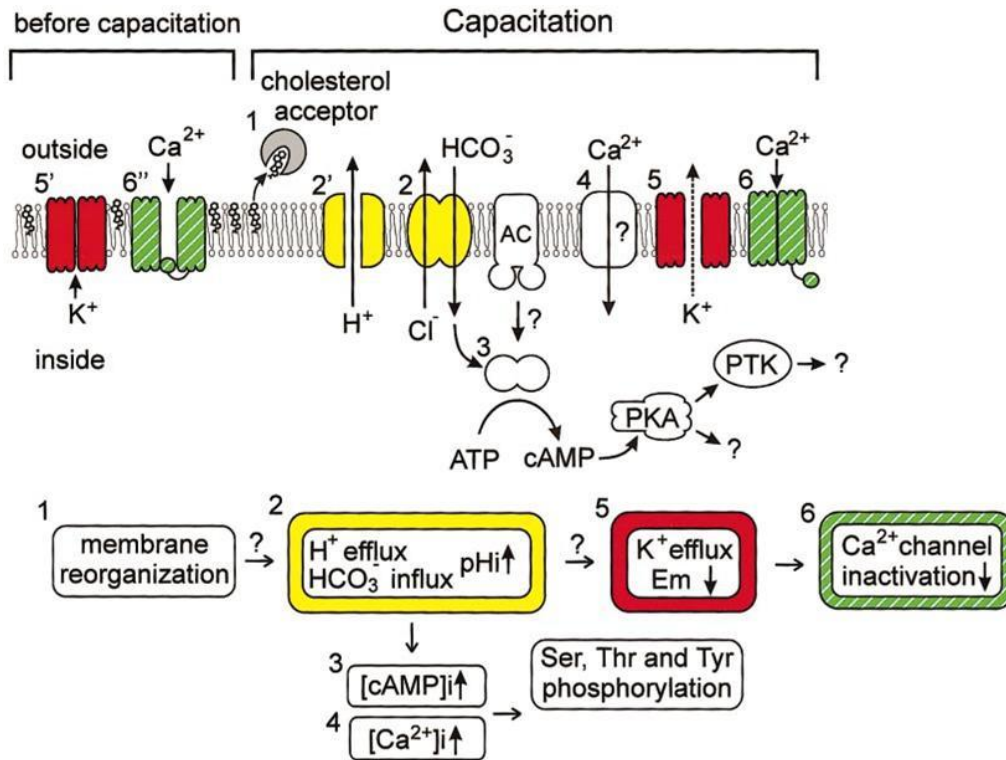
#### 4.5. Mécanisme moléculaire de la capacitation :

Dans l'épididyme la concentration du bicarbonate est de 3-4 mM et dans le tractus génital femelle est  $\geq 20$  mM.

Les lipoprotéines au niveau du tractus génital femelle induisent un efflux de cholestérol, l'efflux de cholestérols induit une augmentation de la fluidité membranaire et permet la diffusion latérale des cholestérols restant.

L'efflux de bicarbonate effectué par les échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  va activer l'adénylate cyclase soluble sAC qui va transformer l'ATP en AMPC, ce dernier va activer les PKA qui va phosphoryler les différentes protéines transmembranaires et intracellulaires dont les protéines Scramblases (**Fig.13**).

La phosphorylation des protéines scramblases par la PKA va induire l'externalisation de PE et PS du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique.



**Figure 13** : Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la capacitation (schéma modifié) (Darszon et al., 2001) l'entrée de  $\text{HCO}_3^-$  par des échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  va entraîner une augmentation du  $\text{pH}_i$  de 0.4 unité environ. L'hyperpolarisation de la membrane passant de -35 mV/-45 mV à -80 mV est une partie due à un efflux de  $\text{K}^+$  par les canaux potassiques type Kir qui s'active par une élévation de  $\text{pH}_i$ . L'hyperpolarisation de la membrane et l'augmentation du  $\text{pH}_i$  permettant aux canaux calciques de passer d'un état inactive à un état activable et finalement l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire de 70 nM à 250 nM, qui va préparer à l'étape qui suit la capacitation et qui est indispensable à la fécondation qui est la réaction acrosomique (RA)

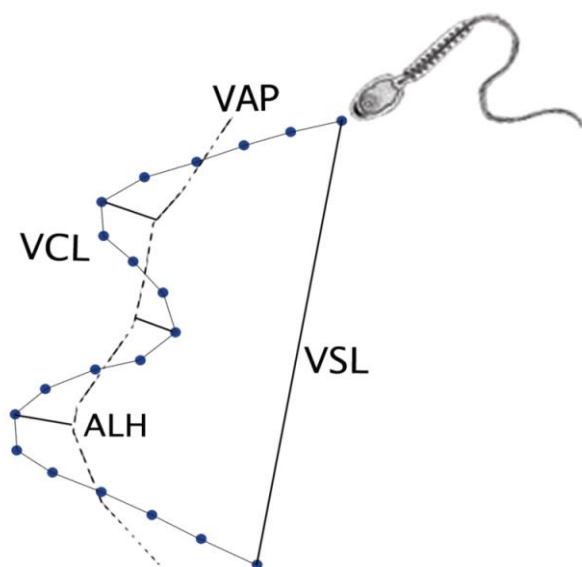
#### 4.6. L'hyperactivation flagellaire

À leur sortie du testicule, les spermatozoïdes bien que complètement différenciés sont très peu mobiles. L'acquisition de la mobilité se produit lors de la maturation épидидymaire. En plus des facteurs présents dans l'épididyme, des molécules de signalisation endogènes aux spermatozoïdes sont associées au développement de la mobilité. Néanmoins, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme sont maintenus dans un état quiescent jusqu'au moment de l'éjaculation. Plusieurs éléments du plasma séminal contribuent à

l'initiation de la motilité dont un pH alcalin et l'abondance de fructose et de  $\text{HCO}_3^-$  (Okamura et al., 1985). Le  $\text{HCO}_3^-$  favorise l'augmentation de la fréquence du mouvement flagellaire et du calcium (Wennemuth et al., 2003). De plus, l'augmentation rapide de la concentration d'AMPc, dépendante de l'activation de SACY par le  $\text{HCO}_3^-$ , est indispensable à la mobilité (Esposito et al., 2004). La hausse du contenu en phosphotyrosine des protéines flagellaires est également associée à l'initiation de la mobilité (Vijayaraghavan et al., 1997).

#### 4.7. Mécanisme moléculaire de la mobilité spermatique après capacitation

Le mouvement flagellaire résulte notamment de l'activité des dynéines-ATPases, dont le rôle est de faire glisser les microtubules entre eux pour provoquer leur courbure. La phosphorylation dépendante de la voie de l'AMPc d'une protéine flagellaire de 36 kDa est montrée pour réguler le glissement des microtubules chez le hamster (Fujinoki et al., 2003). Tous les spermatozoïdes d'un même éjaculat ne sont pas au même stade dans le processus de maturation. La mobilité ne fait pas exception, chaque gamète se déplaçant d'une façon particulière selon son état de maturation post-éjaculatoire. La mobilité est d'abord progressive pour faciliter l'ascension des voies génitales femelles puis elle peut évoluer vers une mobilité hyperactive (**Fig 14**), caractérisée par une augmentation marquée de l'amplitude et de la vitesse de battement du flagelle. Les systèmes d'analyse de la semence assistée par ordinateur (CASA pour **C**omputer **A**ssisted **S**emen **A**nalysis) permettent d'évaluer la motilité en suivant le déplacement de la tête du spermatozoïde. Le déplacement latéral de la tête (ALH), la vélocité curvilinéaire (VCL), la vélocité linéaire (VSL) et la linéarité (LIN :  $\text{VSL}/\text{VCL}$ ) sont autant de paramètres utilisés pour décrire le mouvement des spermatozoïdes. La motilité est considérée hyperactive lorsque l'ALH et la VCL dépassent des limites seuils préétablies et que la LIN diminue. La stringence choisie pour les différents critères varie selon les études. (Figure 9).



**Figure 14** : Illustration de la vélocité curvilinéaire (VCL), la vélocité linéaire (VSL), la vélocité moyenne du trajet (VAP), l'amplitude du déplacement latéral de la tête (ALH).

Plus globalement, l'hyperactivation des spermatozoïdes est caractérisée par le changement de rotation symétrique en rotation asymétrique (Ho and Suarez, 2001). Ils effectuent des

mouvements très vigoureux et rapides. L'hyperactivation facilite la libération physique des spermatozoïdes des cellules épithéliales de l'oviducte (Suarez and Ho, 2003). De plus, l'hyperactivation des spermatozoïdes joue un rôle vital dans la pénétration de la zone pellucide en permettant à ces derniers de traverser le cumulus et la zone pellucide (Ho and Suarez, 2001). Des facteurs physiologiques tels que le calcium, l'ATP, l'AMPc et le bicarbonate sont essentiels au maintien d'une motilité hyperactivée .

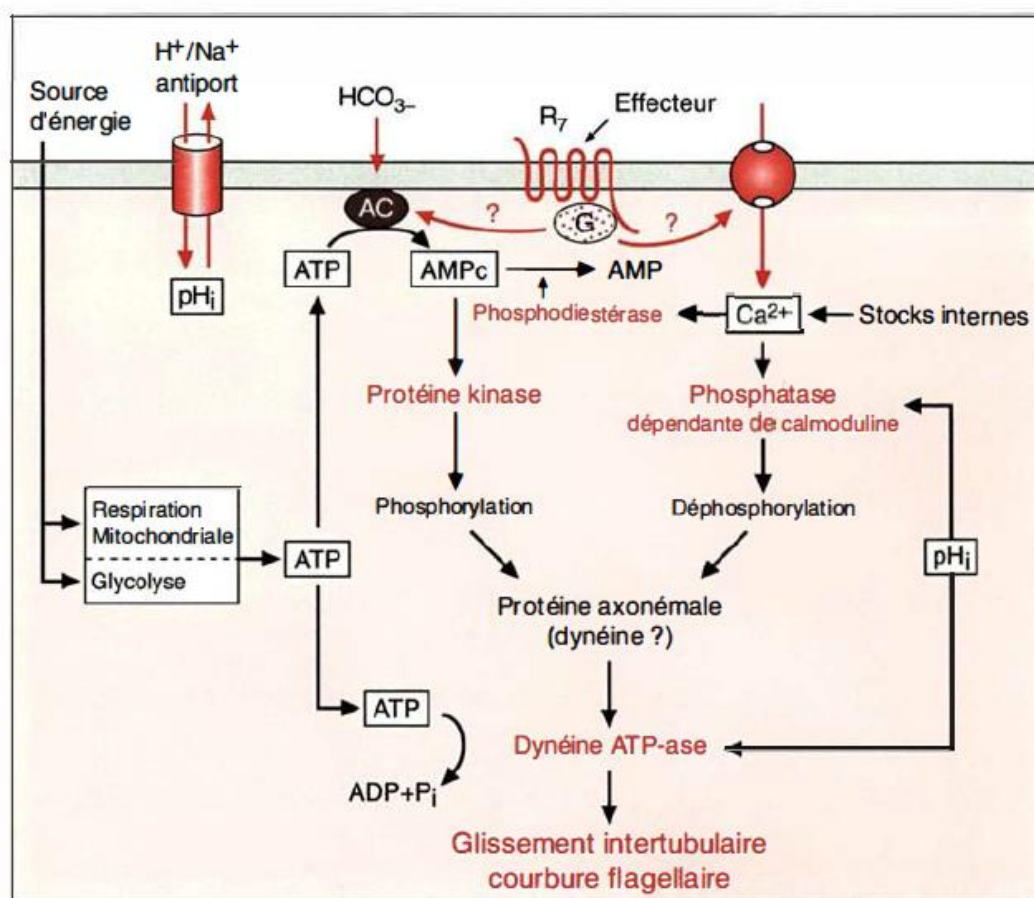
Les changements de conditions du milieu est servir à guider les spermatozoïdes lors de leur transit dans les voies génitales femelles. Les spermatozoïdes seraient guidés jusqu'au site de fécondation d'abord par un gradient thermique (Bahat and Eisenbach, 2010) de chimiotactisme à la progestérone contenue dans les sécrétions du complexe ovocyte et cellules du cumulus (COC) et de l'ovule (Oren-Benaroya et al., 2008). La population de spermatozoïdes humains sensible au chimiotactisme par la progestérone est estimée à moins de 15% et cette sous-population correspondrait aux spermatozoïdes capacités (Cohen-Dayag et al., 1995). Néanmoins, la présence de progestérone dans le fluide folliculaire est requise pour le développement d'une mobilité hyperactive (Jaiswal et al., 1999). Les CatSper sont les principaux médiateurs de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  stimulé par la progestérone (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011). De plus, les spermatozoïdes de souris dont l'un ou l'autre des quatre gènes CatSper est inactivé bien que mobiles, sont incapables de développer une mobilité hyperactive et de se détacher des cellules épithéliales de l'oviducte pour poursuivre leur ascension au-delà du réservoir de sperme (Ho and Suarez, 2001). Ces résultats suggèrent que la progestérone stimule l'activation des CatSper et un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  indispensable à l'hyperactivation des spermatozoïdes.

#### *4.7.1. Mécanisme moléculaire de l'hyperactivité flagellaire*

Les mouvements ioniques à travers la membrane plasmique permettent les modifications de pH et de concentration de calcium intracellulaires, qui règlent l'activité des systèmes de phosphorylation/déphosphorylation actifs sur les protéines axonémales, engendrant glissement inter-tubulaire et courbure flagellaire. L'anion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), indispensable à l'hyperactivation du spermatozoïde, déstabilise la membrane plasmique et activer l'adénylyl cyclase (AC), et ainsi la synthèse d'AMP cyclique qui, active la phosphorylation de cibles, et qui augmente l'entrée de calcium extracellulaire (**Fig 15**). Le pH intracellulaire (pHi), modulé par l'entrée de bicarbonate et par l'antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , serait également un important régulateur du mouvement des spermatozoïdes, agissant sur le calcium intracellulaire et la synthèse d'AMPc. Des récepteurs couplés aux protéines G (R7) existent au niveau des spermatozoïdes,



par exemple de type GABA et récepteurs olfactifs. Qui sont couplés aux canaux calciques et à l'adénylyl cyclase.



**Figure 15 :** Schéma résumant les principaux facteurs impliqués dans la régulation du mouvement flagellaire. (Pierre J ouannet et Catherine Serres 1995)

Bien que les mêmes molécules soient impliquées dans la régulation de la capacitation et de l'hyperactivation, les voies de signalisation impliquée sont différentes et l'hyperactivation de la mobilité n'est pas considérée comme le point terminal de la capacitation (Marquez and Suarez, 2004; Suarez and Ho, 2003; Visconti et al., 2011). Après plus de 25 ans d'effort, force est de constater que la régulation de l'hyperactivation résultant de la relation complexe qui existe entre le  $pH$  intracellulaire, le  $Ca^{2+}$ , l'AMPc et l'ATP n'est pas encore clairement définie (White and Aitken, 1989).

## Conclusion :

La capacitation est un phénomène physiologique complexe qui permet au spermatozoïde d'accomplir sa dernière étape de maturation et ainsi d'acquies sa fécondance. Ce mécanisme dépend de 4 paramètres principaux : la présence d'une molécule qui arrache le cholestérol comme la BSA ou l'HDL qui rend la membrane plasmique du spermatozoïde fluide, la concentration en calcium dans le milieu, la concentration en bicarbonate, anion indispensable pour déclencher les cascades biologiques et finalement, le temps de contact entre le spermatozoïde et ces molécules qui varient d'une espèce à l'autre. La **Figure16** résume toutes ces étapes qui permettent l'obtention d'un spermatozoïde mature près à faire la réaction acrosomique afin de féconder un ovocyte.

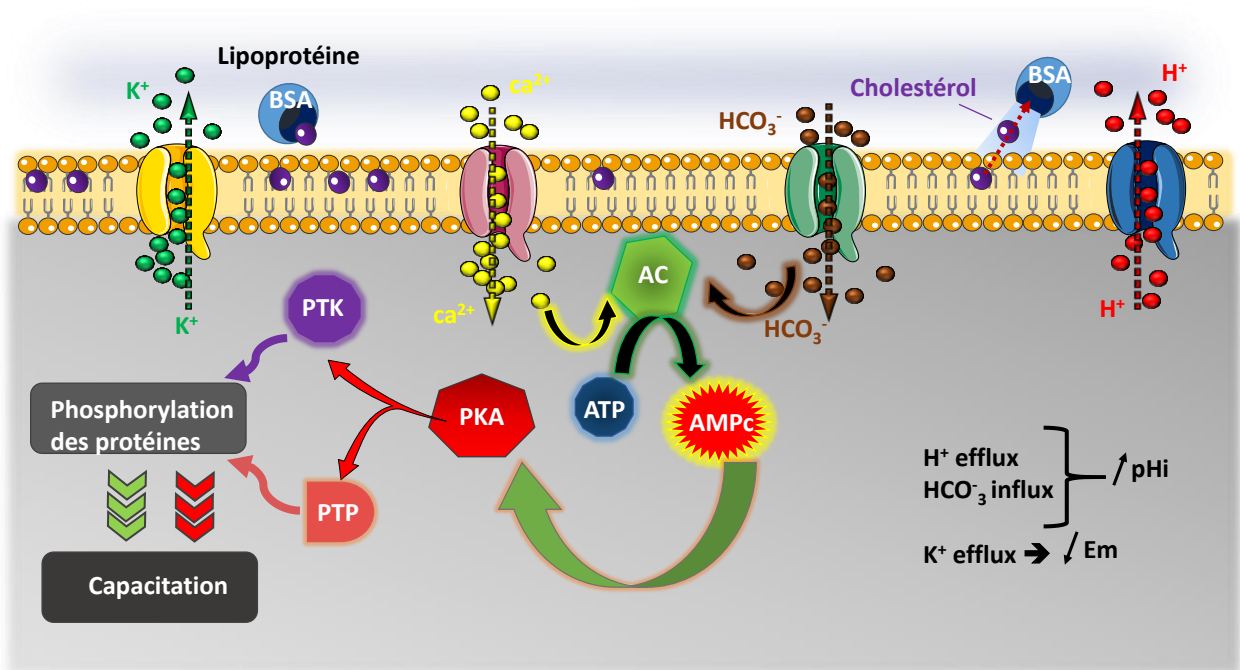


Figure 16: schéma qui montre les grandes étapes de la capacitation (R.Abi Nahed)

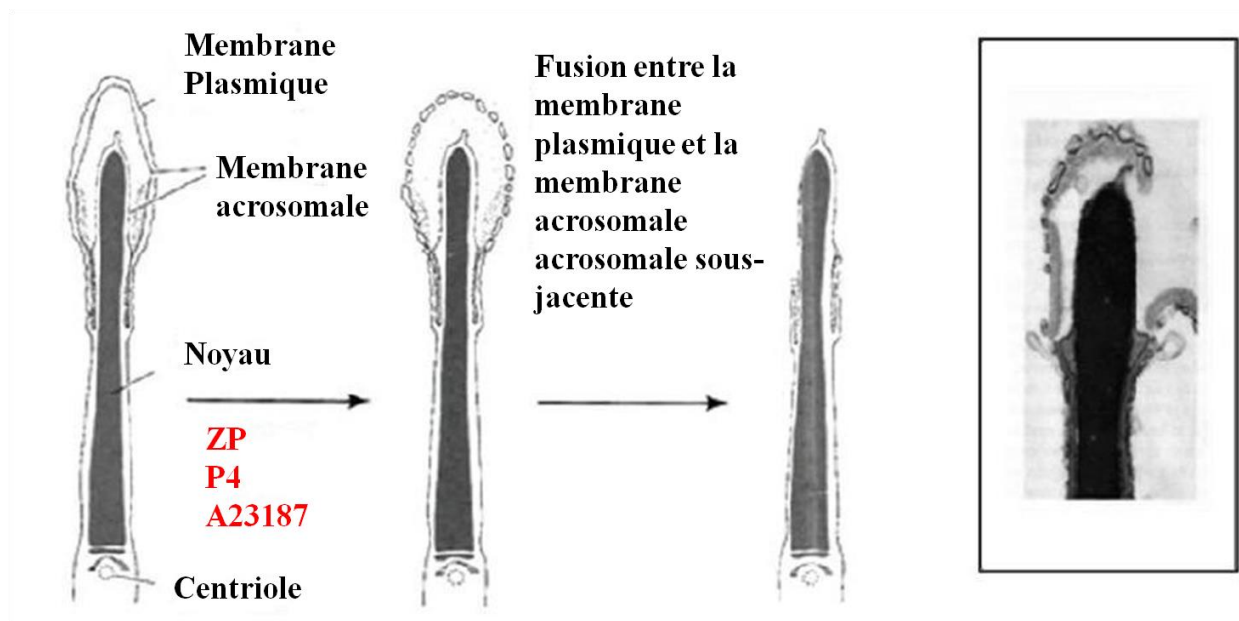


## 5. Chapitre 5 : La réaction acrosomique (RA)

Pour comprendre le lien entre la capacitation et la réaction acrosomique, il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui régulent ces phénomènes.

La réaction acrosomique correspond à l'exocytose de la vésicule de sécrétion (acrosome) située au niveau de la tête des spermatozoïdes. Elle est irréversible et indispensable à la fécondation. Une réaction acrosomique trop précoce (réaction acrosomique spontanée) ne permet pas au spermatozoïde de se fixer à la zone pellucide. Au contraire, un spermatozoïde n'ayant pas effectué sa réaction acrosomique ne peut pas fusionner avec l'ovocyte. La réaction acrosomique est induite *in vitro* par plusieurs molécules, notamment par la progestérone sécrétée par les cellules du cumulus oophorus. La liaison du spermatozoïde à la ZP3 va également activer des récepteurs spermatiques et déclencher des voies enzymatiques impliquées dans la réaction acrosomique (Patrat et al., 2000). Une étude (Michaut et al., 2000) suggère que la fusion membranaire est contrôlée par des protéines conservées quelque soit le type de fusion membranaire. Les protéines impliquées dans le mécanisme de fusion font parties de la famille des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Attachment Protein Receptor).

La réaction acrosomique (RA) n'est pas une exocytose classique, elle s'effectue par la fusion locale des membranes plasmiques et acrosomiques externes, créant des pores qui permettent la libération du contenu acrosomique (**Fig 17**). Il s'agit plus d'une « vésiculation » des membranes, que d'une exocytose de la vésicule acrosomique. Cette vésiculation ne s'opère pas dans la région équatoriale.



**Figure 17 :** Microscopie électronique de spermatozoïdes de souris montre les différentes étapes de la réaction acrosomique : de multiples points de fusion entre les deux membranes acrosomique externe et plasmique au niveau de la région antérieure de la tête ; la vésiculation de la membrane acrosomale et enfin l'exposition du contenu acrosomique et de la membrane acrosomique interne. (D'après Biologie du Développement (Gilbert) ed De Boeck Université page 130) modifié

### 5.1. Liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide

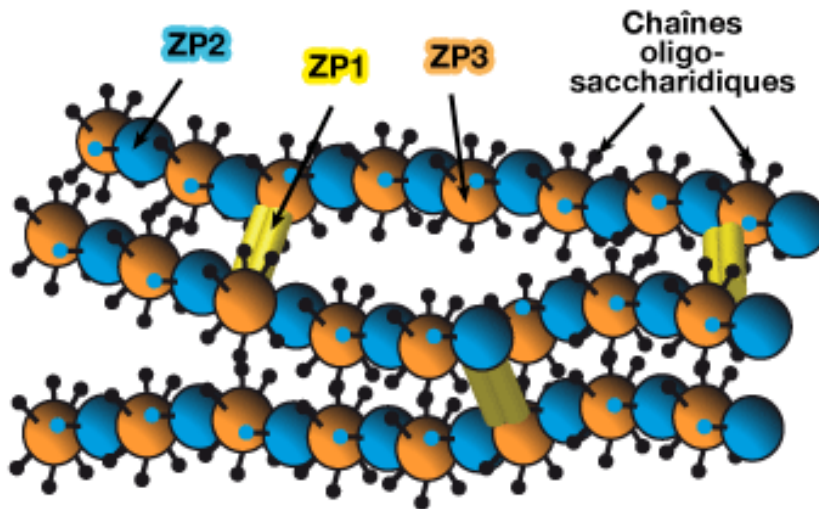
La zone pellucide constitue une matrice extracellulaire de l'ovocyte. Il s'agit d'une structure épaisse et complexe entourant l'ovocyte. Elle intervient lors de l'interaction gamétique en établissant une barrière d'espèce, évitant ainsi des fécondations hétérospécifiques. Son maillage est composé de 3 glycoprotéines ZP1, ZP2 et ZP3. ZP2 et ZP3 s'associent pour former des filaments réunis par des ponts de ZP1 (**Fig 18**) (Mortillo and Wassarman, 1991). L'épaisseur de la zone pellucide est normalement de 12  $\mu\text{m}$ .

La zone pellucide joue quatre rôles principaux pendant la fécondation : elle empêche le brassage inter-espèce, participe au blocage de la polyspermie, assure la protection de l'embryon préimplantatoire et déclenche la réaction acrosomique.

La ZP3 intervient dans la fixation primaire du spermatozoïde à la zone pellucide (Bleil and Wassarman, 1980). Des trois glycoprotéines constituant la ZP, seule ZP3, purifiée à partir d'ovocytes de souris non fécondés, est capable de lier les spermatozoïdes présentant leur acrosome intact (Bleil and Wassarman, 1980; Wassarman, 1990).

Parmi les nombreux récepteurs spermatiques identifiés pouvant jouer un rôle dans la liaison avec ZP3, seule une minorité semble impliquée dans la réaction acrosomique (Wassarman,

1990) comme : la  $\beta$ -galactosyltransferase (GalTase), la protéine SP56 (chez l'homme AM67), la zonoadhésine, la Zona Receptor Kinase (ZRK) et la SP95.

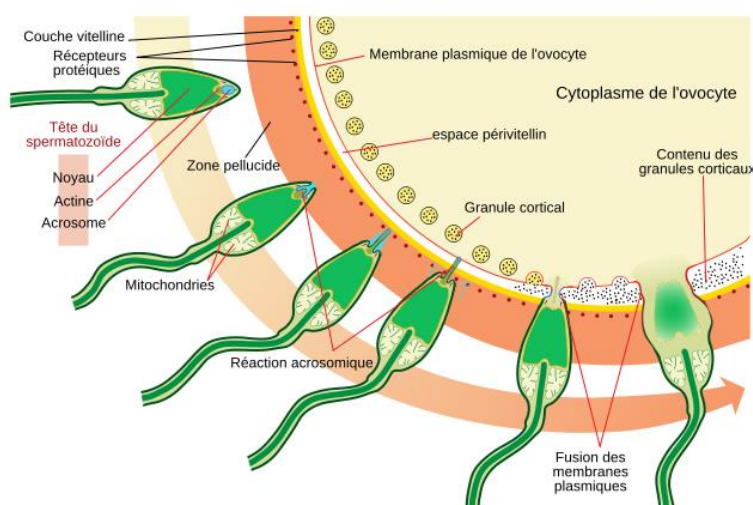


**Figure 18 :** Composition de la zone pellucide : Les protéines ZP2 et ZP3 alternent pour constituer des filaments (hétéropolymères liés par des liaisons covalentes) reliés entre eux par la protéine ZP1 (dimères associés). ZP1, riche en cystéine, établit des ponts disulfures au sein du dimère et avec les hétéropolymères. D'après [www.vetopsy.fr](http://www.vetopsy.fr)

## 5.2. Déroulement de la réaction acrosomique

La réaction acrosomique (RA) est un processus d'exocytose par la fusion des deux membranes plasmique et externe de l'acrosome. Grâce à son mouvement hyperactif et à plusieurs enzymes dont le glycosylphosphatidylinositol GPI-anchored hyaluronidase (PH-20), le spermatozoïde traverse le cumulus oophorus (Baba et al., 2002; Primakoff and Myles, 2002), et arrive au contact de la zone pellucide. Le spermatozoïde se fixe par la partie antérieure de sa tête là où il y a les récepteurs à la glycoprotéine ZP3, traverse la zone pellucide et se retrouve dans l'espace périvitellin (Gadella, 2008; van Gestel et al., 2005; Wassarman, 2009) (**Fig 19**). Le moment exact où a lieu la réaction acrosomique est sujet à débat : certains adoptent la thèse que le spermatozoïde effectue sa réaction acrosomique lors de la traversée du cumulus, d'autres affirment qu'elle a lieu au moment de l'adhésion à la zone pellucide (Baba et al., 2002; Jin et al., 2011; Miranda et al., 2009; Visconti et al., 1998). La réaction acrosomique va aboutir à la libération de la machinerie enzymatique contenue dans la vésicule acrosomique. L'acrosome contient plusieurs enzymes hydrolytiques dont l'acrosine, la p- N-acetylglucosaminidase et la hyaluronidase (Ponce et al., 1994). L'enzyme hydrolytique acrosomale la plus étudiée est sans contredit l'acrosine. L'acrosine est une protéase à serine qui se retrouve en grande quantité dans la matrice acrosomale des spermatozoïdes de mammifères sous forme de proenzyme (proacrosine). Chez l'humain, plus de 90% de l'acrosine se retrouve sous forme de proenzyme. Suite à la réaction de l'acrosome,

elle est clivée en plusieurs formes dont sa forme active, la bêta-acrosine (Kim et al., 2001). La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les fluides génitaux est indispensable à son accomplissement (Nakanishi et al., 2001). Suite à l'afflux intra cellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'acrosine et la hyaluronidase vont être libérées. La hyaluronidase va lyser la matrice d'acide hyaluronique et l'acrosine va hydrolyser une glycoprotéine de la zone pellucide la ZP1. Les deux autres glycoprotéines de la zone pellucide, ZP2 et ZP3 chez la souris, vont devenir moins résistantes et laisser passer les spermatozoïdes qui, grâce à l'hyperactivité de leur flagelle, traversent la ZP et viennent se mettre en contact avec la membrane plasmique de l'ovocyte (Dean, 2004; Gupta and Bhandari, 2011). Tout ce mécanisme nécessite une voie de signalisation compliquée pour relarguer du calcium afin d'activer le complexe SNARE pour induire la fusion des membranes.

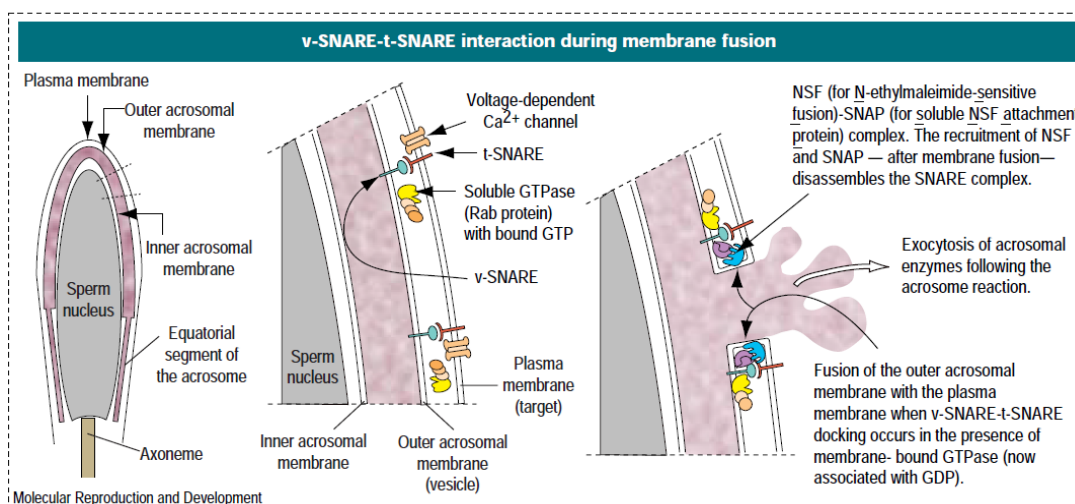


**Figure 19** : Représentation schématique classique des étapes de la réaction acrosomique .d'après LadyofHats et al 2006.

### 5.2.1. Protéine SNARE

Les protéines SNARE (« Soluble NSF Attachment protein REceptors ») sont des protéines transmembranaires localisées de part et d'autre des membranes. Elles interviennent dans le mécanisme de fusion des membranes entre eux, dont la réaction acrosomique : les protéines SNARE de chaque membrane se reconnaissent et s'associent pour former un « complexe SNARE ». Ces protéines sont particulièrement présentes sur l'acrosome de nombreuses espèces de mammifères et interviennent dans la réaction acrosomique. Des analyses immunocytochimiques de sperme d'étalon révèlent que différentes familles de protéines SNARE sont présentes sur l'acrosome, notamment à l'apex de l'acrosome et au niveau du segment équatorial (Gamboa and Ramalho-Santos, 2005) : les SNARE cibles (t-SNARE) comme la syntaxine, les SNARE vésiculaires (v-SNARE) comme la synaptobrevine (ou VAMP « Vesicle Associated Membrane Proteins »), la N-éthyl-maléimide sensitive factor

(NSF) ATPase, et les détecteurs de calcium comme la synaptotagmine (**Fig 20** ). La cavéoline-1 est une protéine de fixation du cholestérol qui est responsable de la morphologie et de l'organisation des caveolae. Les caveolae sont des microdomaines de la membrane plasmique impliqués dans la régulation des mécanismes de signalisation et ayant une fonction d'endocytose et d'internalisation du cholestérol (Gamboa and Ramalho-Santos, 2005). Une équipe a pu montrer (Tsai et al., 2007) la redistribution de ces protéines au cours de la capacitation pour préparer les spermatozoïdes à l'étape suivante de la RA.



**Figure 20 : Représentation schématique du cycle de fonctionnement des protéines SNAREs** : Les protéines Rab3 qui sont des GTPases, quand elles sont actives (c.-à-d. liées au GTP) vont recruter des facteurs d'arrimage. Cela rapproche les deux membranes, induit la fusion de syntaxine et SNAP-25 avec synaptobrevine. C'est la configuration *trans* ou les SNAREs sont ancrées dans deux bicouches lipidiques différentes. La synaptotagmine reserre cette configuration, forçant ainsi la fusion des deux membranes en une seule acquérant la configuration *cis*. Puis NSF, une chaperonne hexamérique ATP dépendante, s'associe avec la protéine adaptatrice  $\alpha$ -SNAP pour hydrolyser les complexes SNAREs formés, en utilisant de l'énergie. (Kierszenbaum, 2000).

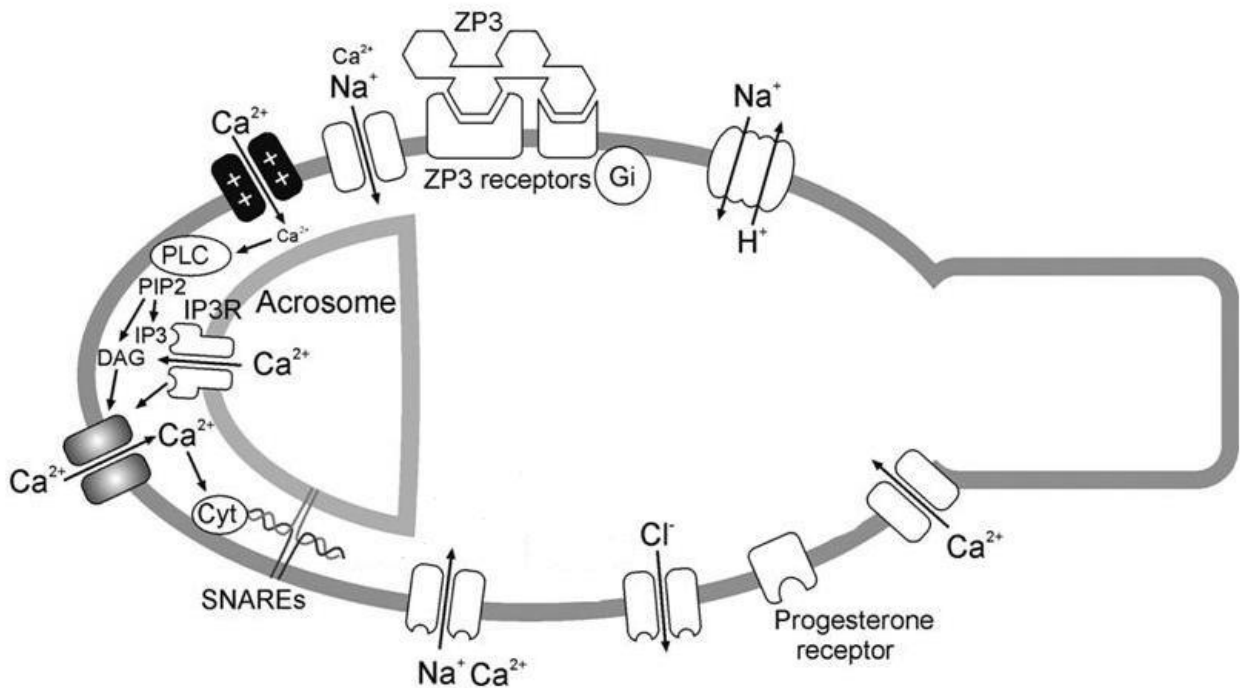
### 5.3.Mécanisme moléculaire de la réaction acrosomique

Lorsque les spermatozoïdes ont traversé le cumulus, ils sont face à la zone pellucide (ZP). On observe alors un contact entre la ZP et la membrane externe des spermatozoïdes, c'est la fixation primaire. Ce contact permet de déclencher la réaction acrosomique. L'un des composants de la ZP, la protéine ZP3 (Darszon et al., 2006), a été impliqué directement dans ce déclenchement. La liaison entre la ZP3 et des récepteurs spermatiques provoque notamment :

- une activation de protéines G,
- une dépolarisation membranaire,

- une entrée de calcium transitoire, via l'activation de canaux calciques voltage dépendant de type T,
- l'activation de la phospholipase C (PLC), enzyme permettant la libération d'IP3 (Inositol triphosphate), pour lequel la membrane interne de l'acrosome possède des récepteurs IP3R.

Les récepteurs spermatiques ne sont pas bien connus, de nombreuses pistes sont ouvertes, impliquant probablement des protéines réceptrices organisées en complexes transmembranaires. L'entrée de calcium transitoire et l'activation de la PLC vont induire une libération des stocks de calcium, probablement à partir de l'acrosome lui-même, puis une activation des protéines SOC (store-operated channel), conduisant à une élévation permanente du calcium interne. Cette élévation de la concentration interne de calcium, provoque l'exocytose de la vésicule acrosomique (**Fig 21**). Cette exocytose fait intervenir les protéines de la machinerie de fusion membranaire comme les protéines VAMP et SNARE qui se sont relocalisées pendant la capacitation.

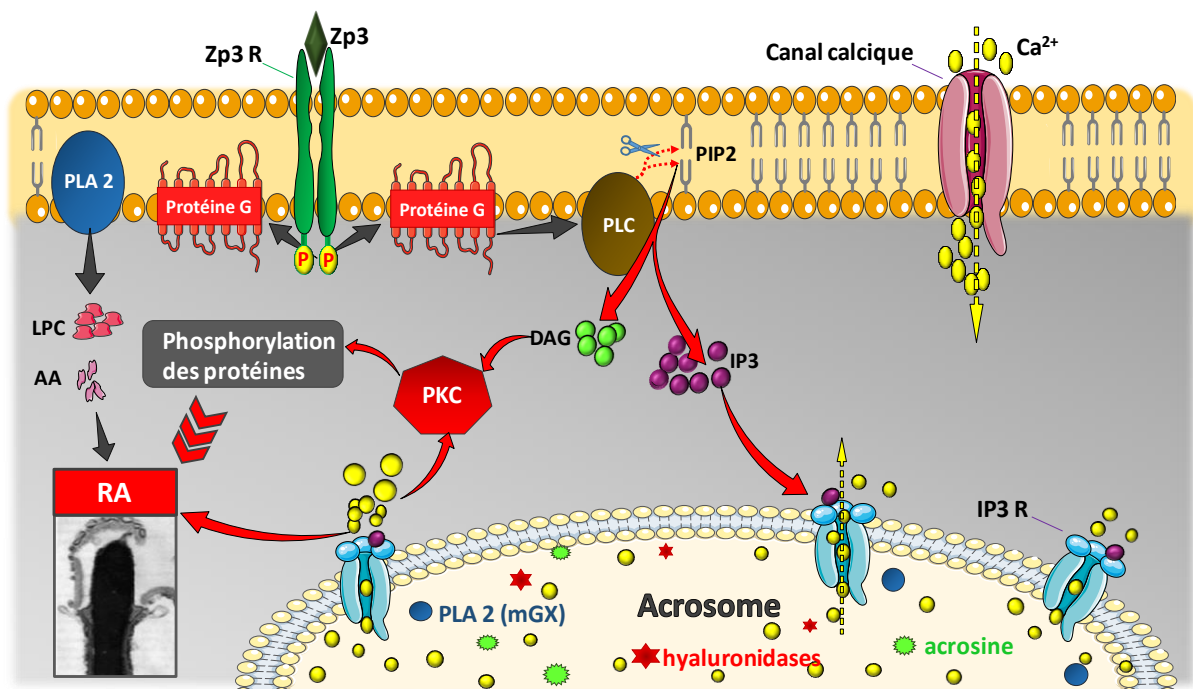


**Figure 21 :** Schéma représentant les cascades de signalisations impliquées dans la réaction acrosomique suite à la liaison du spermatozoïde à la ZP3. Le récepteur spermatique va activer une protéine G qui à son tour va activer la PLC. L'activation de la PLC $\delta$ 4 et de la PLC $\gamma$  hydrolyse le PIP2 présent dans la membrane et génère de l'IP3 et du DAG, l'augmentation du calcium interne va activer la machinerie SNARE nécessaire à la fusion de la membrane (Darszon et al., 2006) modifié.



### 5.3.1. *Le calcium et la réaction de l'acrosome*

Lors de son transit dans le tractus femelle, le spermatozoïde doit reconnaître et lier la matrice extracellulaire de l'ovule, la zone pellucide. Cette liaison initiera la réaction de l'acrosome chez le spermatozoïde capacité, ce qui provoque la fusion de la membrane plasmique et de la membrane externe de l'acrosome. Ce processus permettra la libération d'enzymes de l'acrosome et l'exposition de protéines associées à la membrane interne de l'acrosome (externalisation de protéines nécessaires à la liaison du spermatozoïde). Ceci facilitera le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide et sa fusion avec l'ovocyte. Chez la souris, c'est la liaison d'un récepteur sur la membrane plasmique du spermatozoïde au ligand naturel, la protéine ZP3, qui initiera cette réaction, quoique ce récepteur demeure encore inconnu. Cependant, plusieurs candidats potentiels ont été suggérés (Loewen and Levine, 2005), notamment la  $\beta$ -galactosyltransférase (GalTase) qui servirait à la fois de récepteur de la ZP3 et de récepteur pour certains facteurs décapacitants (Rodeheffer and Shur, 2004a; Rodeheffer and Shur, 2004b). Toutefois, chez l'humain et d'autres espèces de mammifères, il y a quatre glycoprotéines qui composent la zone pellucide, soient ZP1, ZP2, ZP3 et ZPB (ou ZP4) (Tardif et al., 2004). Il semblerait que hZP3 et hZP4 participeraient à l'induction de la réaction de l'acrosome (Chiu et al., 2008). La réaction de l'acrosome est également une réaction  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante qui implique un influx massif de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extracellulaire dans le spermatozoïde. D'ailleurs, le modèle actuel propose que la liaison à la zone pellucide génère une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en trois étapes (**Fig 22**). D'abord, la liaison du spermatozoïde capacité à la zone pellucide provoquerait une augmentation transitoire de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  à partir du milieu extracellulaire causée par la dépolarisation de la membrane qui activerait des VOCCs (Arnoult et al., 1996; Florman, 1994). La liaison à la zone pellucide entraîne également l'activation de protéines G trimériques (Abou-Haila and Tulsiani, 2000). Ces protéines sont bien connues dans les cellules somatiques pour stimuler diverses voies de signalisation et la production de différents seconds messagers. Entre autres, l'activation de la phospholipase C  $\beta$  (PLC) par les protéines Gq a déjà été démontrée (Lee et al., 1992). Ces deux protéines ont été localisées au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes (Walensky and Snyder, 1995). On retrouve également la présence de la PLC $\gamma$  et de la PLC  $\beta$  1 au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes murins et bovins, respectivement (Spungin and Breitbart, 1996; Tomes et al., 1996). Il n'y a pas de doute que la PLC soit très importante pour la réaction de l'acrosome puisque les souris knock-outs pour PLC $\gamma$ 4 ou PLC  $\beta$  1 ont des taux nuls ou faibles de réaction de l'acrosome, respectivement (Choi et al., 2001; Fukami et al., 2001). L'activation de la PLC entraîne l'hydrolyse du PIP2 au niveau de la membrane plasmique pour produire le DAG et l'IP3. Ce dernier effecteur induit la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol à partir des réservoirs intracellulaires en se liant à son récepteur IP3R, dont la présence a été démontrée dans les spermatozoïdes. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  relargué provoquera l'activation des SOC au niveau de la membrane plasmique, créant ainsi un deuxième influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire.



**Figure 22 : Les modifications ioniques durant la réaction acrosomique:** L'interaction de ZP3 avec son récepteur spermatique va induire son autophosphorylation qui en résulte l'activation des protéines G. → Les protéines G vont ainsi activer les PLC. → Les PLC activées vont catalyser l'hydrolyse du PIP2 (phosphatidylinositol diphosphate membranaire) en DAG (diacylglycérol) et iP3 (inositol triphosphate). → L'augmentation intracellulaire du DAG va induire l'activation de la PKC qui résulte en la phosphorylation de diverses protéines et induit la RA. → L'augmentation intracellulaire d'iP3 va activer le récepteur à l'iP3 et permettre une libération massive de calcium de l'acrosome (stock calcique). → Les PLA2 vont être activés par l'augmentation intracellulaire de calcium et par les protéines G, qui vont permettre la production de lysophospholipides et acide gras à partir des lipides membranaire, ces derniers vont induire la RA. (R.Abi Nahed)

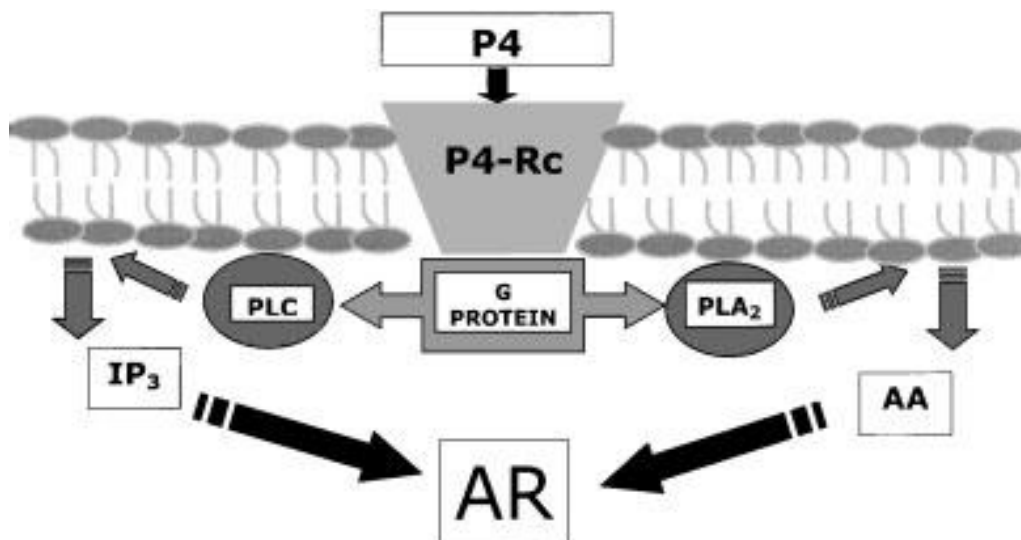
#### 5.4. Mécanismes d'action des différents acteurs de la RA

##### 5.4.1. La réaction acrosomique induite par la progestérone :

La progestérone (P4) est une hormone-clé dans le déclenchement de la réaction acrosomique des spermatozoïdes (**Fig 23**) chez de nombreuses espèces, telles que l'homme (Meizel et al., 1997; Sueldo et al., 1993), la souris (Kholkute et al., 1995; Roldan et al., 1994), le hamster (Llanos and Anabalon, 1996), le porc (Pietrobon et al., 2003) et l'étalon (Cheng et al., 1998a; Cheng et al., 1998b). Son action non génomique passe par une liaison à un récepteur spécifique (P4R), exprimé à la surface des spermatozoïdes matures et capables. Ce dernier a été mis en évidence à la surface des spermatozoïdes humain (Blackmore and Lattanzio, 1991), équin (Cheng et al., 1998b) et murin (Pietrobon et al., 2003). La disponibilité du récepteur à la progestérone pour son ligand augmente durant le transit des spermatozoïdes le long de



l'épididyme, en l'occurrence au cours de la maturation épидидymaire et durant le processus de capacitation. Cependant, la progestérone ne semble pas avoir d'effet au niveau de l'épithélium épидидymaire qui n'exprime pas son récepteur (Misao et al., 1997).



**Figure 23 :** Schéma qui montre la réaction acrosomique induite par la progestérone :

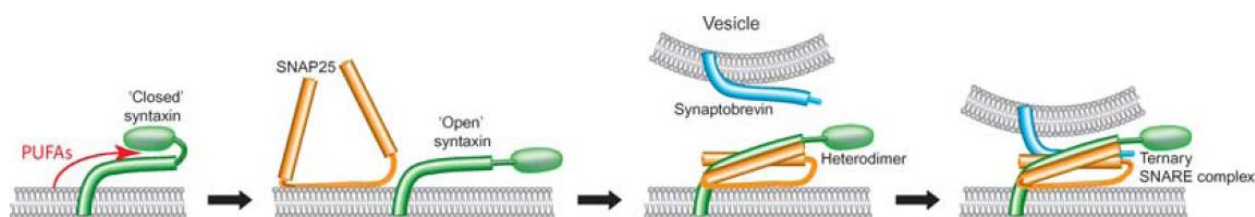
La progestérone (P4) reconnaît son récepteur non génomique spermatique inconnu (P4-RC) qui va activer une protéine G qui à son tour va activer les phospholipase A2 (PLA2) et les phospholipase C (PLC) qui vont induire la réaction acrosomique suite à leurs métabolites qui sont des lipides fusogènes comme l'acide arachidonique (AA) (Pietrobon et al., 2005).

#### **5.4.2. Mécanisme d'action des PLA2 :**

Les PLA2 hydrolysent les glycérophospholipides pour libérer un acide gras libre et un lysophospholipide (Tsai et al., 2007; van Gestel et al., 2005). C'est grâce à cette activité enzymatique, que les PLA2 induisent la RA. En effet, les métabolites de la PLA2, que ce soient les acides gras (Meizel and Turner, 1983) ou les lysophospholipides (Escoffier et al., 2010), sont capables à eux seuls de déclencher la RA. Le rôle de ces deux types de métabolites est complexe. En ce qui concerne les acides gras libres (l'acide arachidonique notamment) (Darios et al., 2007), ils se fixent sur la syntaxine (**Fig 24**). La syntaxine est une protéine transmembranaire de la membrane plasmique. Les acides gras induisent un changement conformationnel de la syntaxine, ce qui l'active. Cette activation permet la fixation de la SNAP-25 (synaptosomal-associated protein) à la syntaxine. L'hétérodimère ainsi formé se fixe alors à la synaptobrevine, protéine transmembranaire de la membrane

acrosomique externe, et cela permet la formation du complexe protéique SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor), qui va aboutir à la fusion entre les deux membranes.

La sPLA2 est libérée pendant la RA et amplifie le processus de fusion de façon autocrine (sur le même spermatozoïde) et de façon paracrine (sur les spermatozoïdes aux alentours), en libérant des lysophospholipides et des acides gras.



**Figure 24 :** Action des acides gras polyinsaturés(PUFA) sur la syntaxine (Darios et al., 2007).

En ce qui concerne les lysophospholipides (la lysophosphatidylcholine notamment), ce sont des lipides fusiogènes, favorisant l'exocytose, avec un mécanisme mal connu.

## 6. Chapitre 6 : Les Phospholipases

### 6.1.Introduction

Les phospholipides incorporés dans la membrane cytoplasmique peuvent être hydrolysés par l'action des phospholipases. Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters des phospholipides. Il existe plusieurs liaisons esters dans un phospholipide : entre l'acide gras et le glycérol, entre le glycérol et le phosphate, et enfin entre le phosphate et l'alcool (choline, éthanolamine, sérine, glycérol, inositol,...). Les quatre liaisons esters du phospholipide définissent les familles de phospholipases. Les phospholipases A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) libèrent l'acide gras en position *sn*-1 du glycérol et forment un lysophospholipide. Les phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) libèrent l'acide gras en position *sn*-2 du glycérol et forment un lysophospholipide. Les phospholipases C (PLC) hydrolysent les phospholipides contenant un inositol, en particulier le phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) libérant ainsi deux seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5- triphosphate (IP<sub>3</sub>). Les phospholipases D (PLD) hydrolysent l'alcool de la fonction acide du phosphate, libérant ainsi un acide phosphatidique et un alcool (**Fig 25**).

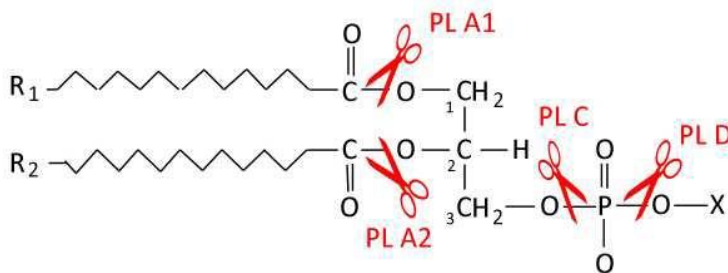


Figure 25 : Les différents sites d'action des phospholipases sur les phospholipides membranaires

#### 6.1.1. Les phospholipases A1

Les PLA<sub>1</sub> catalysent l'hydrolyse de la liaison ester carboxylique des phospholipides, libérant d'une part l'acide gras de la position *sn*-1 du squelette du glycérol et d'autre part un *sn*-2 acyl lysophospholipide. Ces enzymes sont produits par divers tissus et cellules de différents organismes. Les PLA<sub>1</sub> les plus étudiées sont celles du cerveau, du foie, du plasma et du pancréas. Peu des PLA<sub>1</sub> ont été purifiées et caractérisées. Quelques-unes de leurs propriétés générales sont connues. Ces enzymes ne sont pas strictement calcium-dépendant comme il est souvent décrit dans le cas de certaines phospholipases.

### 6.1.2. Les phospholipases C

Les phospholipases C sont des enzymes qui clivent chez les Vertébrés, les têtes polaires des Phospholipides contenant un inositol. Il existe plusieurs types de phospholipase C :

- La phospholipase C-  $\beta$  , qui est activée par les récepteurs couplés aux protéines G.
- La phospholipase C-  $\gamma$  , qui est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase.
- La phospholipase C-  $\delta$  , qui est activée par l'IP<sub>3</sub>.
- La phospholipase C- $\zeta$ , qui est activée comme la phospholipase C-  $\delta$  par l'IP<sub>3</sub>.

Comme tous les messagers secondaires, le DAG et l'IP<sub>3</sub> (produit par la PLC) sont rapidement dégradés en métabolites inactifs au sein de la cellule. Le DAG a plusieurs molécules cibles : parmi les cibles connues, on retrouve la protéine kinase C, qui, comme la protéine kinase A (PKA), phosphoryle spécifiquement des protéines sur les résidus sérine et/ou thréonine ou certains canaux de la famille des TRPC (transient receptor potential cation channels) (Lucas et al., 2003). La molécule cible de l'IP<sub>3</sub> est un canal calcique, « le récepteur à l'IP<sub>3</sub> ». On sait depuis 1990 que l'IP<sub>3</sub> et le DAG sont impliqués dans la réaction acrosomique. En effet, lors de réactions acrosomiques induites par l'ionophore calcique A23187, les concentrations intracellulaires de DAG et d'IP<sub>3</sub> augmentent dans les spermatozoïdes de bélier (Roldan and Murase, 1994) ou de verrat (Roldan and Vazquez, 1996), à la suite d'une stimulation d'une phospholipase C (Roldan and Murase, 1994). Différents types de phospholipases C pourraient être impliquées dans cette activité. L'étude menée par Tomes et al 1996 a démontré l'existence d'une PLC  $\gamma$  1 dans les spermatozoïdes de souris (Tomes et al., 1996), soulignant également que l'activité de cette enzyme était dépendante d'une activité tyrosine kinase. Une PLC  $\beta$  1 a également été identifiée dans la région acrosomique des spermatozoïdes de mammifères (Walensky and Snyder, 1995). L'étude menée par Heytens a montré la présence d'une phospholipase C : la PLC $\zeta$  au niveau de la région équatoriale de la tête dans les spermatozoïdes humains par immunohistochimie et western blot (Heytens et al., 2009; Yoon et al., 2008). Cette phospholipase est impliquée dans les vagues calciques indispensables à l'activation ovocytaire (Parrington et al., 1999; Parrington et al., 2002; Parrington et al., 1996; Saunders et al., 2002; Yoon et al., 2008) et sa perte induit une infertilité masculine (Heytens et al., 2009; Yoon et al., 2008).

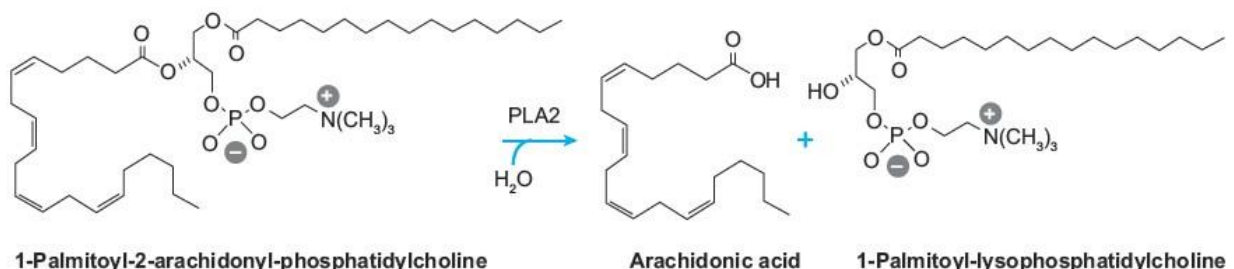
### 6.1.3. Les phospholipase D

Il existe deux grandes familles de PLD chez les mammifères, définies selon la sensibilité au PIP2. Certaines PLD sont activées par la PIP2, d'autres non. Dans le groupe des PLD PIP2-sensibles on distingue deux classes :

- La PLD1, dont l'activation se fait grâce à des petites protéines G de la famille ARF (Factor d'ADP-ribosylation) et Rho, et par les protéines kinases C (PKC) (Hammond et al., 1997).
- La PLD2, (PIP2-insensibles), elles sont activées par les acides gras, comme l'acide oléique, (Frohman et al., 1999). Elles sont appelées PLD-oléate-dépendantes. Les PLD sont localisées au niveau des cavéoles, qui sont des domaines spécialisés au niveau de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides, appelés lipid rafts ou radeaux lipidiques (McDermott et al., 2004).

### 6.1.4. Les phospholipases A2

Les phospholipases A<sub>2</sub> catalysent l'hydrolyse en position *sn*-2 des phospholipides, libérant un acide gras et un lysophospholipide (**Fig 26**). Le développement de nouvelles techniques biologiques a permis de montrer l'implication de ces enzymes dans de très nombreuses fonctions cellulaires dont certains sont impliqués dans la physiologie spermatique comme la réaction acrosomique ou la mobilité flagellaire (Escoffier et al., 2010).



**Figure 26 :** Une réaction catalysée par les PLA<sub>2</sub> donnant un acide gras et un lysophospholipide (Lambeau and Gelb, 2008).

De même, les PLA<sub>2</sub>, par leur action favorisent ou retardent le développement de nombreuses pathologies. Leur intérêt dans ce travail, est relatif à la régulation de la signalisation impliquée dans la biologie de la reproduction et du développement pour améliorer les techniques de procréation médicalement assistée (AMP). Dans ce chapitre, je vais présenter les six types de PLA<sub>2</sub> et pour chacun d'eux : les différentes formes, les groupes, les sous-groupes, les mécanismes d'action, les propriétés biologiques, l'implication dans diverses pathologies et les divers inhibiteurs sélectifs développés contre les PLA<sub>2</sub> afin de mieux comprendre leur rôle biologique. À l'heure actuelle, plus d'une trentaine d'enzymes possédant une activité PLA<sub>2</sub> ont été identifiées chez les mammifères. Ces enzymes sont classées en différentes catégories

selon leurs structures, leurs mécanismes catalytiques, leurs localisations (**Tableau 2**) ainsi que leurs relations évolutives. Ainsi, ces différentes PLA2 sont regroupées en six grandes catégories : les PLA2 sécrétées (sPLA2), les PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium (cPLA2), les PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium (iPLA2), les platelet-activating factor acétylhydrolase (PAF-AH), les PLA2 lysosomales et enfin les adipose-specific PLA2 (adPLA). (Burke and Dennis, 2009; Kudo and Murakami, 2002; Lambeau and Gelb, 2008; Schaloske and Dennis, 2006; Valentin and Lambeau, 2000). voir le tableau 2 qui représente la grande famille des PLA2.

**Tableau 2:** La grande famille des Phospholipases A2 Adapté de (Dennis et al., 2011; Schaloske and Dennis, 2006).

Types	Groupes	Sous-groupes	Masse moléculaire (kDa)	Résidus catalytiques
sPLA <sub>2</sub>	GI	A, B	13-15	His/Asp
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA <sub>2</sub>	GIV D(δ),	A(α), B(β), C(γ), E(ε), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
iPLA <sub>2</sub>	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA <sub>2</sub> ), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
LPLA <sub>2</sub>	GXV	A (α1), B(α2), β	26-40	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

#### 6.1.4.1. Les phospholipases A<sub>2</sub> intracellulaires

Les PLA2 intracellulaires regroupent la famille des cPLA2 et des iPLA2, également appelées patatin-like phospholipase domain-containing lipases (PNPLA), bien que certaines PAF- AH

et les PLA2 lysosomales soient également localisées à l'intérieur de la cellule. Actuellement 6 cPLA2 et 9 iPLA2 sont répertoriées chez les mammifères voir **tableau 3**.

**Tableau 3:** Classification des phospholipases A2 intracellulaires. (Adapté de Murakami et al.2011)

Famille	Classification	Autre nom	Besoin en calcium
cPLA <sub>2</sub>	IVA	cPLA <sub>2</sub> α	+
	IVB	cPLA <sub>2</sub> β	+
	IVC	cPLA <sub>2</sub> γ	-
	IVD	cPLA <sub>2</sub> δ	+
	IVE	cPLA <sub>2</sub> ε	+
	IVF	cPLA <sub>2</sub> ζ	+
iPLA <sub>2</sub>	VIA	iPLA <sub>2</sub> β PNPLA9	-
	VIB	iPLA <sub>2</sub> γ PNPLA8	-
	PNPLA6	iPLA <sub>2</sub> δ	-
	PNPLA7	NRE	-
	PNPLA3	iPLA <sub>2</sub> ε	-
	PNPLA2	iPLA <sub>2</sub> ζ	-
	PNPLA4	iPLA <sub>2</sub> η	-
	PNPLA5	GS2-like	-
	PNPLA1		-

#### **6.1.4.1.1. Les PLA2 cytosoliques dépendantes du calcium (cPLA2)**

Les cPLA2 (groupe IVA, B, C, D, E, F ) présentent des hauts poids moléculaires (60-85kDa) et sont impliquées dans la signalisation cellulaire en contrôlant la libération d'acide arachidonique et de médiateurs lipidiques dérivés de ce dernier (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) (Ghosh et al., 2006). Les cPLA2 sont caractérisées par la présence d'un domaine C2 (domaine de liaison au calcium) au niveau N-terminal et sont dépendantes du calcium. Il y a cependant une exception avec la PLA2 du groupe IVC appelée cPLA2<sub>γ</sub> puisqu'elle est dépourvue du domaine C2.

#### ***6.1.4.1.2. Les PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium (iPLA2)***

Le premier membre de cette famille d'enzyme a été cloné en 1994 à partir de macrophages et a été appelé iPLA2 VIA (ou iPLA2 $\beta$ ) (Ackermann et al 1994). Actuellement, il y a 9 enzymes de ce groupe qui sont répertoriées dans le génome humain. Ces enzymes sont également appelées patatin-like phospholipase domain-containing lipases ou PNPLA1-9 (**tableau3**).

Les membres de ce groupe partagent un domaine protéique commun découvert dans la patatin, la protéine la plus abondante de la pomme de terre. Les enzymes de ce groupe ont toutes une activité enzymatique indépendante du calcium. L'appellation PNPLA semble être plus appropriée puisque plus de la moitié des enzymes de ce groupe fonctionnent principalement comme des lipases plutôt que comme des phospholipases (Murakami et al 2011). Les iPLA2 (groupe VIA, B, C, E, F) sont des enzymes de hauts poids moléculaires (85-90 kDa) et interviennent dans le métabolisme des phospholipides membranaires (Wilkins and Barbour, 2008). Elles pourraient également participer à la libération d'acide arachidonique et à la signalisation cellulaire. Il faut savoir aussi qu'il existe des PLA2 intracellulaires indépendantes du calcium de type lysosomale (iPLA2, groupe XV).

#### ***6.1.4.2. Les phospholipases A2 sécrétées***

Les sPLA2 sont des enzymes de 14 à 19 kDa ayant un domaine de liaison au calcium ainsi qu'un site catalytique conservé chez les mammifères. Le site catalytique est constitué d'une histidine et d'un acide aspartique. L'histidine, généralement en position 48, est essentielle pour leur activité enzymatique (Murakami et al 2011). Cette propriété est d'ailleurs utilisée afin de générer des mutants enzymatiquement inactifs qui conservent un repliement tridimensionnel intact. Ceci permet donc d'étudier le rôle de l'activité catalytique de ces enzymes. Généralement, l'histidine est remplacée par une glutamine et les mutants ainsi obtenus sont suivis de l'appellation H48Q (Janssen et al 199). La sPLA2 XIIB est enzymatiquement inactive due à la présence d'une leucine à la place d'une histidine au niveau du site catalytique ce qui souligne l'importance de l'histidine dans le site catalytique (Rouault et al 2003). Les sPLA2 de mammifères ont toutes des caractéristiques communes, notamment une structure compacte très riche en ponts disulfures (plus de 10% des acides aminés), ce qui leur confère une grande stabilité et rigidité. Cependant, ces protéines ont moins de 50% d'identité entre elles (Valentin and Lambeau, 2000). On distingue différents groupes de sPLA2, dont les groupes I, II, III, V, X et XII présents chez les mammifères (**Tableau 4**). Le génome humain contient neuf sPLA2, celui de la souris en contient dix, incluant la sPLA2 GIIC, qui n'existe que sous forme de pseudogène chez l'homme.



**Tableau 4:** Classification des phospholipases A2 secrétés. Adapté de (Dennis et al., 2011; Schaloske and Dennis, 2006).

Groupe	Source	Masse moléculaire (kDa)	Nombre de ponts disulfure
IA	cobras et crotales	13_15	7
IB	homme/pancreas de porc	13_15	7
IIA	crotale; liquid synovial humaine	13_15	7
IIB	Vipère du Gabon	13_15	6
IIC	rat/testicule de souris	15	8
IID	homme/souris pancreas/foie	14_15	7
IIE	homme/souris cerveau/coeur/utérus	14_15	7
IIF	homme/ testicule de souris /embryon	16_17	6
III	lézard/abeille	15_18	8
	homme/souris	55	8
V	homme/souris coeur/poumons/macrophage	14	6
IX	escargot (conodipine-M)	14	6
X	homme foie/thymus/leucocyte	14	8
XIA	Pousses de riz vert (PLA <sub>2</sub> -I)	12.4	6
XIB	Pousses de riz vert (PLA <sub>2</sub> -II)	12.9	6
XIIA	homme/souris	19	7
XIIB	homme/souris	19	7
XIII	parvovirus	<10	0
XIV	champignon/bacteries	13_19	2

La famille des PAF acetyl-hydroxylase (PAF-AH) a été plus tard reconnue comme un groupe de PLA<sub>2</sub> avec une spécificité pour une courte chaîne acyle en position *sn*-2 et pour les lipides oxydés dans le plasma. Leur substrat majeur naturel est le PAF(Arai et al., 2002; Zimmerman et al., 2002). Ce groupe est également désigné *lipoprotein-associated phospholipase A2* (Lp-PLA<sub>2</sub>). Ces enzymes ont été classées dans les groupes VII et VIII. Les groupes IX à XIV sont de nouvelles PLA<sub>2</sub> dont la séquence ou l'organisation des ponts disulfures diffère des groupes I, II, III et V. Le seul nouveau type de PLA<sub>2</sub> identifié qui n'appartient à aucun des quatre types de PLA<sub>2</sub>, sécrété, cytosolique ou calcium indépendant, est la LPLA<sub>2</sub>, qui a été classée dans le groupe XV. Récemment un nouveau groupe de PLA<sub>2</sub> a été isolé à partir de tissus adipeux de mammifères et classé dans le groupe XVI. Il s'agit d'un nouveau groupe de PLA<sub>2</sub> appelé adipose-PLA<sub>2</sub> (Ad-PLA<sub>2</sub>).

## *6.2. Mécanismes d'activation des différents types de PLA<sub>2</sub>*

### *6.2.1. Phospholipase A<sub>2</sub> Cytosolique (cPLA<sub>2</sub>)*

#### *6.2.1.1. Activation calcique*

La concentration intracellulaire augmente en réponse à un stimulus extracellulaire, qui induit aussi la translocation de PLA<sub>2</sub> G IV A du cytosol vers la région de la membrane péri-nucléaire (Channon and Leslie, 1990). La fixation du calcium sur le domaine C2 est cruciale pour la translocation mais pas pour l'activité catalytique (Dessen et al., 1999). La fixation du calcium provoque un changement conformationnel dans le domaine C2 pour stabiliser la structure du domaine (Hsu et al., 2008). Cette conformation rigidifiée du domaine C2 est cruciale pour l'orientation correcte du domaine de liaison à la membrane phospholipidique, conduisant à l'activation de l'enzyme et facilitant l'hydrolyse phospholipidique.

#### *6.2.1.2. Activation par PIP<sub>2</sub> et C1P*

La liaison de PLA<sub>2</sub> GIVA au second messenger, la phosphatidylinositol-4, 5 –bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) peut aussi activer l'enzyme sans l'implication du calcium (Mosior et al., 1998). Cette activation calcium indépendante peut induire une augmentation intracellulaire de PIP<sub>2</sub> et une libération d'acide arachidonique (Balsinde et al., 2000). L'activation par la PIP<sub>2</sub> requiert la présence du domaine C2 (Six and Dennis, 2003). La Céramide 1-phosphate (C1P) est un sphingolipide bioactif phosphorylé impliqué dans l'inflammation (Lamour and Chalfant, 2005), et dans la signalisation cellulaire en tant que un second messenger. C1P se fixe directement au domaine C2 de PLA<sub>2</sub> G IVA. Contrairement à l'activation par PIP<sub>2</sub>, celle de C1P est calcium dépendante.

#### *6.2.1.3. Phosphorylation*

Les fonctions cellulaires et l'activité enzymatique de PLA<sub>2</sub> GIVA sont régulées par une phosphorylation qui aurait lieu sur le résidu Ser-505 de la PLA<sub>2</sub> GIVA et serait initiée par la MAP kinase et la PKC (Lin et al., 1993).

### *6.2.2. Phospholipases A<sub>2</sub> Calcium-indépendantes (iPLA<sub>2</sub>)*

#### *6.2.2.1. Activation des iPLA2 par l'ATP*

La régulation de l'ATP est très importante pour de nombreuses fonctions cellulaires, notamment à l'intérieur de la mitochondrie. PLA<sub>2</sub> GVIA est exprimée à l'intérieur de la mitochondrie dans divers types cellulaires (Brookes et al., 2004). L'ATP stabilise la structure ou active PLA<sub>2</sub> GVIA, sans en être un substrat, ni un cofacteur (Lio and Dennis, 1998). L'ATP empêche la dimérisation et l'oxydation de la cystéine de PLA<sub>2</sub> GVIA, ce qui lui permet de maintenir son activation (Song et al., 2006).

#### *6.2.2.2. Inhibition des iPLA2 par la calmoduline*

La calmoduline est activée par la fixation de quatre ions de calcium qui induisent un changement de conformation (Chin and Means, 2000). Les protéines de fixation de la calmoduline peuvent être régulées par le calcium intracellulaire *via* la calmoduline. Bien que l'activité de PLA<sub>2</sub> GVIA soit calcium indépendante, l'activation de la calmoduline par le calcium inhibe son activité (Jenkins et al., 2001).

#### *6.2.2.3. Activation des iPLA2 par l'oligomérisation.*

De nombreux travaux rapportent que PLA<sub>2</sub> GVIA est actif sous la forme d'un oligomère de 340 kDa, formé par un tétramère de l'enzyme de 85kDa. Cette conformation est favorisée par les ankyrines, de façon similaire à l'interaction protéine-protéine observée chez NFκB (Sedgwick and Smerdon, 1999). D'autres protéines de régulation pourraient s'associer pour permettre l'oligomérisation.

### *6.2.1. Phospholipase A<sub>2</sub> Sécrétées (sPLA<sub>2</sub>)*

Les sPLA<sub>2</sub> ont été étudiées pour la première fois à partir du venin de cobra. Elles requièrent pour leur activité catalytique une quantité de calcium de l'ordre du milli-molaire.

### *6.3. Les récepteurs des phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées*

Les sPLA<sub>2</sub> de venins (vPLA<sub>2</sub>) de serpents exercent une multitude d'effets pharmacologiques. Elles peuvent être neurotoxiques, myotoxiques ou cardiotoxiques (Kini, 2003). Les effets biologiques et pathologiques induits par les vPLA<sub>2</sub> ne peuvent pas être expliqués par la simple activité d'hydrolyse des phospholipides. Ceci est particulièrement évident dans le cas de certaines sPLA<sub>2</sub> de venins de serpent qui ont perdu leur effets enzymatiques à cause d'une mutation au niveau du site actif, mais sont encore

myotoxiques ce qui implique la présence d'un récepteur en plus de leur activités catalytique (Lomonte et al., 2009).

Deux types de récepteurs spécifiques pour les sPLA2 ont été identifiés (Lambeau et al., 1989; Lambeau and Lazdunski, 1999; Lambeau et al., 1990).

### ***6.3.1. Les récepteurs de type N***

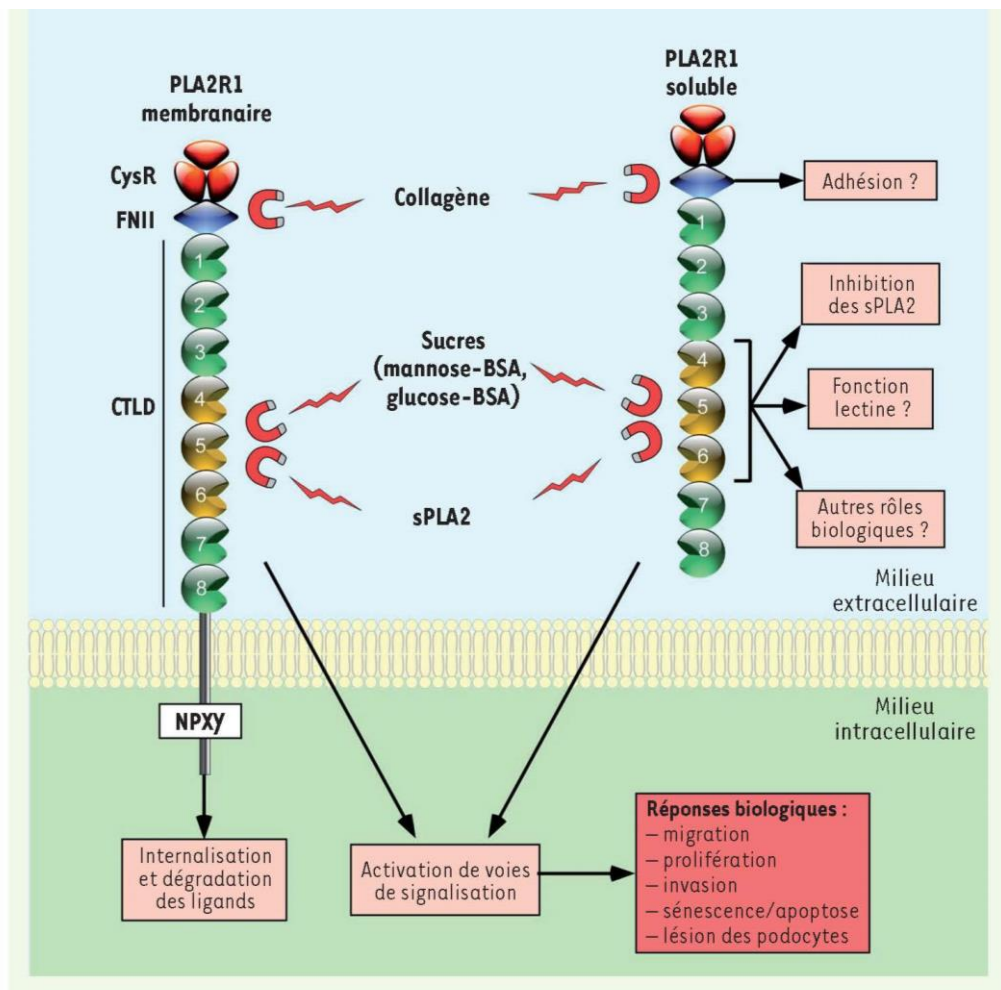
Les récepteurs N correspondent à une famille de protéines présentes en grande quantité dans le cerveau de rat, où ils ont d'abord été identifiés (Lambeau et al., 1989). Ces récepteurs sont également exprimés dans d'autres tissus comme le poumon, le foie, le cœur et le rein. Plusieurs vPLA2 neurotoxiques lient les récepteurs N avec une haute affinité. Par opposition, les vPLA2 non neurotoxiques, se lient avec une faible affinité à ces récepteurs.

### ***6.3.2. Le récepteur de type M***

Le récepteur M est une protéine de 180 kDa a été identifié dans une culture primaire de muscle squelettique de lapin (Lambeau et al., 1989; Lambeau and Lazdunski, 1999; Lambeau et al., 1990). Présentant des propriétés de liaison distinctes de celles des récepteurs de type N. Le récepteur M humain est abondamment exprimé dans les reins et à plus faibles niveaux dans le placenta, les poumons et le muscle squelettique (Ancian et al., 1995). Chez la souris, il est exprimé majoritairement dans le rein, le poumon, le côlon et les glandes salivaires et à des niveaux plus faibles dans le cœur et le foie (Cupillard et al., 1999). En effet, le récepteur M est capable de lier à la fois les sPLA2 toxiques des sPLA2 non toxiques avec de très hautes affinités. Contrairement aux récepteurs de type N.

Le récepteur M est organisé en 5 régions distinctes (Fig 27) :

- un domaine N-terminal riche en cystéine
- un domaine fibronectine de type II
- une région centrale contenant 8 domaines distincts de reconnaissance des sucres
- un seul domaine transmembranaire
- une courte région C-terminale intracellulaire



**Figure 27 :** Structure schématique et fonctions moléculaires possibles de PLA2R1. PLA2R1 est composé d'une large région extracellulaire, d'un seul segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant un motif d'internalisation (NPXY). La région extracellulaire comprend : un domaine riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FNII) qui lie le collagène, et huit domaines lectines de type C (CTL D), dont les domaines CTLD4 à -6 (en jaune) qui lient les sPLA2 et certains sucres. PLA2R1 peut exister sous forme membranaire ou soluble. En liant certaines sPLA2, PLA2R1 pourrait, via l'activation de diverses voies de signalisation, relayer la transduction de certains de leurs effets biologiques ou, inversement, inhiber leur action via leur internalisation et leur dégradation. En liant d'autres ligands, PLA2R1 pourrait aussi agir indépendamment des sPLA2. BSA : bovine serum albumin. (Girard et al., 2014)

A ce jour, on ne sait pas si un de ces deux récepteurs (N ou M type) est exprimé dans les testicules ou dans les gamètes (ovocyte et spermatozoïde).

## 6.4. Inhibiteurs chimiques

De nombreux inhibiteurs de sPLA<sub>2</sub> ont été identifiés (Oslund et al., 2008). Ces inhibiteurs sont importants pour déterminer quels types de sPLA<sub>2</sub> sont impliqués dans des effets biologiques et obtenir de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Les premières molécules découvertes étaient des inhibiteurs non spécifiques qui agissent soit sur le substrat phospholipidique (par exemple la mépacrine et la quinacrine) soit sur l'histidine du site actif comme le bromure de bromophénacyle ou sur les acides aminés du domaine interfacial comme le manoalide (Dal Piaz et al., 2002).

### 6.4.1. Premiers développements d'analogues phospholipidiques

Les premières tentatives de développement des inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> se focalisèrent sur des analogues phospholipidiques. Parmi les inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> issues du venin de cobra la 1-Stearyl-2-stearoylaminodeoxy phosphatidylcholine serait moins active qu'un dérivé de la phosphatidylethanolamine et les analogues phospholipidiques contenant un groupement phosphate en position *sn*-2 de la chaîne carbonée du glycérol (Yuan et al., 1990). Ces molécules inhibent faiblement la sPLA<sub>2</sub> hGIIA.

### 6.4.2. Indoles

En 1995, il a été découvert un inhibiteur très puissant de la sPLA<sub>2</sub> qui possède une structure indole. Les indole-3-acétamides exercent une interaction avec le site actif des enzymes. LY315920 ou Varespladib est un inhibiteur de PLA<sub>2</sub> GIIA humaine. Les dérivés de LY315920, l'indoxame (Yokota et al., 1999) et bien d'autres composés de cette famille ont été rapportés dans le cadre du développement d'inhibiteurs des sPLA<sub>2</sub>. Lehr a développé une série d'indoles, tels que des dérivés de l'acide 3-acyl-indole-2- carboxylique (Lehr, 1996) comme inhibiteurs des cPLA<sub>2</sub>. Divers composés ont été ainsi développés pour leur propriétés et sont utilisés en clinique. Les études de spécificité sur l'ensemble des sPLA<sub>2</sub> montrent cependant que ces inhibiteurs ne sont pas spécifiques de la sPLA<sub>2</sub> hGIIA, mais inhibent plusieurs sPLA<sub>2</sub> de la collection I/II/V/X. Par exemple, le Meindoxam a une forte affinité pour les sPLA<sub>2</sub>-IIA, IIE et V et une plus faible pour les sPLA<sub>2</sub> IIC, IID et X (Singer et al., 2002).

### 6.4.3. Trifluorométhyl Kétones, Polyfluorokétones et Tricarbonyles

Plusieurs composés, substitués de trifluorométhyl Kétones ont des effets inhibiteurs sur la PLA<sub>2</sub> GIVA. Le premier inhibiteur de PLA<sub>2</sub> GIVA fut l' *arachidonoyl trifluorométhyl ketone*

(AACOCF3) (Street et al., 1993). AACOCF3 exerce une inhibition dose dépendante sur l'enzyme. Récemment, l'inhibition par AACOCF3 a montré une réduction des déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer (Kalyvas and David, 2004). Plusieurs composés trifluorométhyl-kétones ont une action inhibitrice sur PLA<sub>2</sub> GVI, avec une action jusqu'à 10 fois plus importante que celle obtenue sur PLA<sub>2</sub> GIVA. La pentafluoroéthyl kétone, FKGK18 sont d'autres composés ayant une action inhibitrice sur PLA<sub>2</sub> GVIA. Cette classe d'inhibiteurs a permis de montrer le rôle de PLA<sub>2</sub> GVIA dans le développement de scléroses (Kalyvas et al., 2009).

#### *6.4.4. Pyrroles et Pyrrolidines*

Une série de substituts de pyrroles a été développée. Plusieurs de ces molécules ont une activité similaire à AACOCF3. La pyrrophénone est un inhibiteur de PLA<sub>2</sub> GIV qui agit sur la libération de l'acide arachidonique, la formation de la prostaglandine E<sub>2</sub>, la thromboxane B<sub>2</sub> et la leucotriène B<sub>4</sub> (Lehr, 1996).

#### *6.4.5. Methyl Fluorophosphonates*

MAFP (Methyl Arachidonyl Fluorophosphonate) est un inhibiteur irréversible de PLA<sub>2</sub> GIVA et PLA GVIA (Lio et al., 1996). L'administration de MAFP prévient de manière dose dépendante l'hyperalgésie (Svensson et al., 2005).

#### *6.4.6. Bromoenol Lactone*

Bromoenol lactone (BEL) est un inhibiteur covalent irréversible de PLA GVIA (IC<sub>50</sub> = 8 µM.). (Song et al., 2006) Rapportent que cette inhibition se fait par la production de bromométhyl keto-acide qui va induire une alkylation des groupements thiols de la cystéine, plutôt que de générer un intermédiaire acyl-enzyme vers le site actif de la sérine. Dans les cellules 3T6, BEL inhibe la libération d'acide arachidonique et la production de PGDE<sub>2</sub> stimulées par le sérum de veau foetal (Sanchez and Moreno, 2001). Cet inhibiteur agit à de très faibles concentrations comparativement aux inhibiteurs des PLA<sub>2</sub> calcium dépendantes. Toutefois, BEL peut avoir une action sur les autres familles PLA<sub>2</sub>. L'utilisation de cet inhibiteur requiert donc une confirmation par d'autres types d'inhibiteurs.

#### *6.4.7. Produits naturels*



Dans les années 1980, le manoalide 37 un sesterpène, produit naturel fut le premier inhibiteur de PLA<sub>2</sub> de venin de cobra, du venin d'abeille et du liquide synovial humain découvert (Lombardo and Dennis, 1985). Il a été isolé chez l'éponge *Luffariella variabilis*, avec une activité anti-inflammatoire *in vivo*. Plusieurs composés naturels sont en phase d'étude clinique pour leur propriété d'inhibition de sPLA<sub>2</sub>. Le thielocine B3 et YM-26567 sont des inhibiteurs naturels de la sPLA<sub>2</sub> (Tanaka et al., 1994).

#### 6.4.8. Autres inhibiteurs

L'Annexine V appartient à une famille de protéines qui interagit avec les phospholipides d'une manière calcium dépendante pour inhiber l'activité de PLA<sub>2</sub> GIVA (Mira et al., 1997). D'autres composés tels que les Aryl-sulfonamides, les dérivés de 9,10-Dihydro-9,10-ethanoanthracene, une série de pyrimidines, agissent de manière spécifique sur PLA<sub>2</sub> GIVA.

Néanmoins, aucune molécule n'est aujourd'hui capable d'inhiber l'activité enzymatique des sPLA<sub>2</sub> des groupes III et XIIA. Certains de ces inhibiteurs ont été utilisés dans des essais cliniques. Ils n'ont pas permis d'obtenir un effet thérapeutique dans l'asthme, le choc septique ou l'arthrite rhumatoïdale. Cependant, le LY315920 (varespladib ou A-002) apparaît intéressant dans son effet anti-athérosclérose (Koenig et al., 2009; Rosenson and Gelb, 2009; Suckling, 2009). Compte tenu de la sélectivité d'action des différentes sPLA<sub>2</sub> (cf ci-dessous), il apparaît nécessaire d'obtenir des inhibiteurs spécifiques pour chaque membre de la famille des sPLA<sub>2</sub> de mammifères : ces molécules permettront de mieux définir les fonctions propres de chaque enzyme et devraient avoir un meilleur potentiel thérapeutique que les inhibiteurs ci-dessus dans différentes indications médicales, tout en limitant de potentiels effets secondaires.

Les PLA<sub>2</sub> sont impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques comme les maladies de l'inflammation ou cardiaques (Hui, 2012; Murakami et Lambeau 2013), l'industrie pharmaceutique a fait des efforts importants pour découvrir des composés spécifiques ayant une forte affinité pour inhiber les PLA<sub>2</sub> (Dennis et al. 2011), afin de mieux comprendre le rôle des PLA<sub>2</sub> dans la RA. Pour les sPLA<sub>2</sub>, LY 329722 (LY) est un composé intéressant, qui a été développé par Eli Lilly Pharmaceuticals à partir d'un composé principal, LY 311727, un inhibiteur très puissant de hGIIA (Schevitz et al. 1995). LY 329722 inhibe plusieurs sous-groupes de sPLA<sub>2</sub> (I / II / V / X) et présente une IC<sub>50</sub> de 30 nM pour la sPLA<sub>2</sub> du groupe X. Pour iPLA<sub>2</sub>, deux inhibiteurs ont émergé: S-lactone BromoEnol (BEL) et FKKGK18. BEL est un inhibiteur sélectif et irréversible de iPLA<sub>2</sub>β avec une inhibition d'environ 60 nM après une pré-incubation (Ackermann et al. 1995). Bien qu'il soit un puissant inhibiteur de iPLA<sub>2</sub>β, BEL inhibe également les enzymes non-PLA<sub>2</sub> (Ali et al. 2013). Pour cette raison FKKGK18 a été identifié récemment comme un nouvel inhibiteur d'iPLA<sub>2</sub>β, présentant moins d'effets sur les enzymes non-PLA<sub>2</sub> avec la même puissance sur les iPLA<sub>2</sub>β (Ali et al. 2013). Il est déjà connu que les inhibiteurs de iPLA<sub>2</sub>β inhibent 200 à 400 fois plus les iPLA<sub>2</sub>β que les cPLA<sub>2</sub>α et sPLA<sub>2</sub>, respectivement (Dennis et al. 2011). FKKGK18 est donc un outil précieux pour étudier les rôles des iPLA<sub>2</sub>β au cours de la RA. Enfin, la pyrrolidine-1 (Pyr-1), un inhibiteur à base de pyrrolidine, a été identifié pour inhiber cPLA<sub>2</sub>α (IC<sub>50</sub> = 70 nM). Des essais *in vitro* ont montré qu'il est moins puissant sur cPLA<sub>2</sub>γ et iPLA<sub>2</sub>β



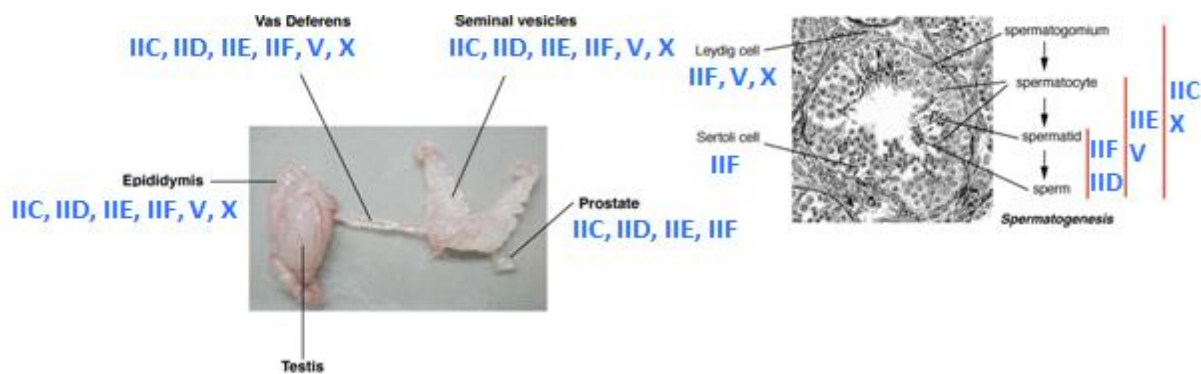
(CI50 ~ 10  $\mu$ m). Pyr-1 à 10  $\mu$ M n'a pas d'effet sur les PLA<sub>2</sub> sécrétées groupes IIA, X et V (Ghomashchi et al. 2001).

## *6.5.Fonction des Phospholipases dans le cadre de la biologie de la reproduction*

### *6.5.1. L'intérêt de la sPLA<sub>2</sub> du groupe X (sPLA<sub>2</sub>-X)*

Des études qui montrent l'implication des phospholipases A<sub>2</sub> dans le mécanisme de la réaction acrosomique ont été faites à partir d'inhibiteurs des PLA<sub>2</sub>. Leurs résultats montrent que le traitement des spermatozoïdes de bélier (Garde and Roldan, 1996; Roldan and Frago, 1993), d'hamster (Llanos et al., 1993), de cochon d'Inde (Singleton and Killian, 1983) et d'humain (Fry et al., 1992) par des inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> tels que le Rho 31-4493, la quinacrine dihydrochloride, le pbromophenacyl- bromide, le PBx et la mepacrine diminuent le pourcentage de réaction acrosomique qu'elle soit spontanée ou induite par le ionophore calcique A23187. La diminution du taux de réaction acrosomique par l'inhibiteur de PLA<sub>2</sub> peut être restaurée par l'addition de lysoPC et d'acide arachidonique (Garde and Roldan, 1996; Llanos et al., 1993). Ces résultats fournissent des preuves solides pour penser que les PLA<sub>2</sub> peuvent avoir un rôle essentiel dans le mécanisme de la réaction acrosomique. Une autre preuve de l'implication des phospholipases A<sub>2</sub> dans le mécanisme de la réaction acrosomique a été établie par une équipe qui a montré que le traitement des spermatozoïdes de hamster par un anticorps dirigé contre la phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée IB a inhibé la réaction acrosomique spontanée (Riffo and Parraga, 1996). Les diverses études montrant l'implication des messagers lipidiques et des phospholipases dans le mécanisme de contrôle de la réaction acrosomique ont permis d'établir un modèle dévoie de régulation lipidique de la réaction acrosomique chez la souris (Baldi et al., 2000).

Une étude immunohistochimique chez la souris a permis de déterminer la localisation des sPLA<sub>2</sub>, au niveau des organes reproducteurs mâles. Ainsi, un large panel de sPLA<sub>2</sub> est exprimé dans ces organes. Les cellules spermatogéniques, l'épididyme, le canal déférent et les vésicules séminales expriment les sPLA<sub>2</sub> des groupes -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -V et -X ; la prostate exprime les sPLA<sub>2</sub> des groupes -IIC, -IID, -IIE et -IIF (Masuda et al., 2004) et le spermatozoïde mature exprime la sPLA<sub>2</sub> de groupe X (Escoffier et al., 2010) (**Fig 28**). Cependant, à l'heure actuelle, les raisons d'une telle diversité, ainsi que le rôle spécifique des sPLA<sub>2</sub> au niveau des organes reproducteurs mâles, sont peu connus.



**Figure 28 :** Localisation des sPLA<sub>2</sub> au niveau de l'organe reproducteur mâle et du tubule séminifère de souris. D'après (Masuda et al., 2004).

Un rôle de la sPLA<sub>2</sub> III dans la maturation des spermatozoïdes a été mis en évidence au niveau de l'épididyme. Cette enzyme agit sur les phosphatidylcholines de la membrane plasmique des spermatozoïdes. Son absence chez les mâles déficients en sPLA<sub>2</sub> GIII (Souris KO) entraîne un appauvrissement de leur membrane en acide gras polyinsaturés de type  $\omega$ -3 et un enrichissement en acides gras polyinsaturés de type  $\omega$ -6 et  $\omega$ -9 (Sato et al., 2010). Ces modifications lipidiques sont responsables de malformations sur les spermatozoïdes (mobilité réduite, anomalies du flagelle et de l'acrosome). Finalement, le croisement de mâles déficients avec des femelles WT donne une diminution de nombre des souriceaux par rapport au control.

Les phospholipase A2 sont impliquées dans le remodelage lipidique qui contribue à la fécondation, ainsi que le témoigne leurs forte expression dans les organes génitaux males (Eerola et al., 2006), dans le sperme éjaculé (Escoffier et al., 2010) et dans le tractus génital femelle. La phospholipase A2 sécrétée du groupe X (PLA2-X, mGX pour le modèle murin) est la seule sPLA2 présente dans le sperme de souris (Escoffier et al., 2010). Il a été montré que cette enzyme participe au remodelage des phospholipides durant la *capacitation*, notamment au niveau de la membrane flagellaire (Lishko et al., 2011) ; cette action permet de moduler la mobilité spermatique. La sPLA2 est aussi présente dans l'acrosome des spermatozoïdes murins et libérée sous forme active lors de la réaction acrosomique (en particulier lors de la RA spontanée). Cette enzyme a un rôle d'activateur très puissant de la RA (Escoffier et al., 2010). Par ailleurs, la mGX augmente de façon significative des taux de fécondation l'absence de la mGX (chez des animaux modifiés génétiquement mGX KO) diminue le taux de fécondation in vitro et altère le développement embryonnaire. Inversement, si une population des spermatozoïdes provenant de ces animaux est traitée avec mGX sous forme recombinante, on observe une augmentation du taux de fécondation qui varie suivant le modèle de souris fertile utilisé.

Il a été montré qu'une cascade régulant la réaction acrosomique chez la souris peut être déclenchée par la fixation de la progestérone (P4) sur son récepteur, en activant les protéines G, dont il active les PLA2 et les PLC simultanément (Pietrobon et al., 2005).

L'ensemble des données concernant les sPLA2 indique que ces enzymes jouent un rôle crucial dans les différentes étapes de la maturation des spermatozoïdes et dans la fertilité. Mais cependant les raisons de leur diversité au niveau des organes reproducteurs mâles sont peu connues. Malgré la présence de différentes sPLA2 dans un même type cellulaire, les pathologies observées chez des souris KO en III et X, montrent des fonctions non redondantes, selon leur localisation, dans 2 étapes majeures de la fertilité masculine : l'isoforme III régule la maturation épидидymaire, et le sPLA2 X intervient durant la capacitation et la réaction acrosomique.

### **6.5.2. La cPLA2**

L'inactivation de la phospholipase A2 cytosolique (cpla2 $\alpha$ ), qui catalyse la formation d'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires, est responsable d'une baisse de la fertilité et de la prolificité, surtout des grave probleme pendant la mise bas des femelles homozygotes pour l'allèle cPLA2 (Kita et al., 2006).

### **6.5.3. L'iPLA2**

Il a aussi été décrit la présence de l'iPLA2 de type VIA au niveau des spermatozoïdes de souris par la technique de Western Blot. Cette iPLA2 semble jouer un rôle important dans la physiologie spermatique. En effet des travaux effectués à partir d'animaux, dont le gène de la iPLA2 VIA a été invalidé montre que l'absence de l'iPLA2 VIA induit une forte diminution de la mobilité spermatique et une réduction notable du taux de fécondation voir stérilité pour le croisement mâle et femelle Ko (Bao et al., 2004).

### **6.5.4. La phospholipase D**

L'implication de la phospholipase D dans la réaction acrosomique a été étudiée (Garbi et al., 2000) à l'aide de techniques d'immunohistochimie et de western blot. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de la PLD de type 1 au niveau de l'acrosome des spermatozoïdes de bovins et l'activation de la PLD1 est assuré par la protéine kinase C (PKC). Son activation va lui permettre de se transloquer de l'acrosome vers la membrane acrosomique externe (Garbi et al., 2000). Sur la base de ces résultats, il a été supposé que la PLD activée par la PKC serait transportée au niveau de la membrane acrosomique externe, où l'enzyme active pourrait générer l'acide phosphatidique (PA) qui aidera à l'induction de la réaction acrosomique.

### 6.5.5. La phospholipase B

La phospholipase B, précédemment désigné comme une PLA<sub>2</sub>, n'en est pas clairement une à ce jour. Les membres PLB1, PLB2, et PLB3 peuvent hydrolyser les substrats phospholipidiques en position sn-1 et sn-2 (Jones et al., 2007). Deux nouvelles études (Asano et al., 2013a; Asano et al., 2013b) ont identifié une phospholipase B (PLB), qui est activée suite à l'arrachement du groupe stérol par les accepteur de cholestérol (BSA ou 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2-OHCD)) de la membrane plasmique des spermatozoïdes. En inhibant la PLB les capacités des spermatozoïdes seront réduite à la fois de subir la RA et de féconder les ovocytes *in vitro*, ce qui suggère un rôle important dans la fécondation et la réaction acrosomique.

## 6.6. Autres fonctions biologiques des phospholipases

### 6.6.1. Fonctions antivirale et anti bactérienne des sPLA<sub>2</sub> (Groupes sPLA<sub>2</sub>I, II, III, V, et X)

Plusieurs travaux démontrent la fonction anti bactérienne des sPLA<sub>2</sub>. sPLA<sub>2</sub> GIIA a une action contre les bactéries Gram-positives (Menschikowski et al., 2013; Menschikowski et al., 2006) telles que *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, et les bactéries Gram-négatives telles que *E. coli* et *Salmonella typhimurium*. De même, la concentration de sPLA<sub>2</sub> GIIA dans le sérum de patients atteints de pathologies sévères, est 500 fois plus élevée que chez des sujets sains. Cette enzyme présente dans le liquide séminal, les alvéoles et la lumière intestinale, élimine par sa surexpression chez des souris transgéniques, la mortalité liée à l'infection de *Staphylococcus aureus* (Laine et al., 1999). Les souris transgéniques exprimant la sPLA<sub>2</sub> GIIA humaine, sont résistantes à l'infection par *B. anthracis*. Cette activité antibactérienne est calcium dépendante et est inhibée par l'éthylène glycol bis (2-aminoéthylether)-N,N'-tétracétique acid (EGTA) (Weinrauch et al., 1998). En ce qui concerne l'activité antivirale des sPLA<sub>2</sub>, les sPLA<sub>2</sub> GIII, GV et GX peuvent prévenir l'infection par un adénovirus. sPLA<sub>2</sub> GV et GX, par leur activité enzymatique convertissent la phosphatidylcholine (PC) en lysoPC dans la membrane de cellules hôtes. Cette hydrolyse de la membrane plasmique empêche l'entrée de l'adénovirus (Mitsuishi et al., 2006). La sPLA<sub>2</sub> GX humaine a la particularité de reconnaître et de dégrader l'enveloppe du HIV (Kim et al., 2007).

### 6.6.2. Hydrolyse des phospholipides

PLA<sub>2</sub> GIVA hydrolyse l'acide arachidonique en position sn-2 des phospholipides membranaires, en réponse à un stimulus externe, (Uozumi and Shimizu, 2002). L'acide arachidonique libre est métabolisé par la voie de la cyclooxygénase (COX) ou celle de la lipooxygénase (LOX). Des synthases convertissent l'acide arachidonique et génèrent la prostaglandine et la thromboxane.

### 6.6.3. Coagulation

Comme plusieurs sPLA2 de venins, les sPLA2 de mammifères possèdent des effets anti-coagulants. Certaines sPLA2 anti-coagulantes agissent par hydrolyse des phospholipides. C'est le cas pour la sPLA2 de groupe X, la sPLA2 de venin d'abeille et celle de venin de *Naja mossambica mossambica* (Mounier et al., 2000).

### 6.6.4. Inflammation

Plusieurs sPLA2 jouent différents rôles dans l'inflammation, notamment dans la production des médiateurs lipidiques. La sPLA2 de groupe IIA pourrait jouer un rôle important dans l'inflammation. Elle est fortement exprimée dans les sites inflammatoires. Sa concentration dans le sérum et les tissus inflammés corrèle avec la sévérité de plusieurs maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïdale, le choc septique, la maladie de Crohn, la pancréatite, l'asthme ou les accidents cardiovasculaires (Koenig et al., 2009). Des souris transgéniques surexprimant la sPLA2-X dans les macrophages développent une pathologie inflammatoire pulmonaire et meurent rapidement après la naissance (Curfs et al., 2008). Ceci est probablement dû à la forte activité catalytique de cette enzyme. Des souris C57BL/6 invalidées pour la sPLA2-IIA présentent une susceptibilité pour l'arthrite rhumatoïdale plus faible que des souris Balb/C exprimant la sPLA2-IIA, suggérant un rôle de cette sPLA2 dans le développement de cette pathologie (Kennedy et al., 1995). Des souris invalidées pour la sPLA2 de groupe X montrent une réduction de l'induction de l'asthme contrairement aux souris sauvages (Henderson et al., 2007). Des souris transgéniques qui surexpriment la sPLA2 de groupe III humaine montrent une inflammation de la peau (Sato et al., 2009).

### 6.6.5. Cancer

La sPLA2 GIIA est surexprimée dans les cancers de la prostate chez l'homme et chez les patients atteints d'adénome colorectal d'origine familiale (Dong et al., 2010; Jiang et al., 2002). Ces résultats rendent compte de l'implication des sPLA2 dans le développement de tumeurs. L'activation de PLA2 GIVA serait impliquée dans la croissance des cellules cancéreuses du sein via l'oestrogène (Caiazza et al., 2011). L'inactivation de PLA2 GIVA chez la souris a développé 43% de tumeurs de moins que des souris sauvages toutes exposées à un produit cancérogène (Meyer et al., 2004). Les rôles potentiels de certaines sPLA2 dans la carcinogénèse font l'objet de nombreuses études, cependant les fonctions pro- ou anti-cancéreuse et les mécanismes d'action de ces dernières restent encore controversées.

## 6.7. Conclusion

Les phospholipases A<sub>2</sub> ont été étudiées depuis plus d'un siècle (**Tableau 5**). Elles ont été extraites initialement du venin d'une variété de serpents, et à partir d'extraits de pancréas de mammifères. Dans ce chapitre, j'ai mis l'accent sur les fonctions biologiques des PLA<sub>2</sub>, principalement en tant qu'enzymes qui rentrent dans les différents mécanismes de la reproduction (Réaction acrosomique et la fécondation). Le développement d'antagonistes et d'agonistes de ces enzymes permet de développer des composés pharmacologiques capables de moduler leurs fonctions cellulaires. De toutes les fonctions étudiées chez les PLA<sub>2</sub>, celle qui m'intéresse le plus est de bien comprendre l'intervention dans ces enzymes dans les différentes étapes de la fécondation et d'essayer d'expliquer le rôle de ces PLA<sub>2</sub> pour améliorer la fécondation. En dessous vous trouvez le **tableau 6**, qui résume tous les inhibiteurs utilisés couramment pour inhiber les PLA<sub>2</sub>, dont le but d'étudier le rôle de ces dernières dans les différents mécanismes cellulaire.

**Tableau 5:**Classification des phospholipase A<sub>2</sub> et les pathologies associées aux phospholipase A<sub>2</sub> secrétées (Quach et al., 2014)

PLA <sub>2</sub> Family	Group	Gene Name	Source	MW (kDa)	Catalytic Residues	[Ca <sup>2+</sup> ]	Pathologies
cPLA <sub>2</sub>	IVA to F	PLA2G4A to F	Human/murine	60–85	Ser/Asp	μM	N/A
iPLA <sub>2</sub>	VIA to F	PLA2GVIA to F	Human/murine	28–146	Ser/Asp	None	N/A
PAF-AH	VIIA & VIIB	PLA2G7A, PLA2G7B	Human/murine/ porcine/bovine	40–45	Ser/His/Asp	None	N/A
	VIIIA & VIIB	PLA2G8A, PLA2G8B	Human	~26	Ser/His/Asp		N/A
L <sub>y</sub> -PLA <sub>2</sub>	XV	PLA2G15	Human	~45	Ser/His/Asp	None	N/A
AdPLA <sub>2</sub>	XVI	PLA2G16	Human Adipocyte	~18	His/Cys	None	N/A
sPLA <sub>2</sub>	IA	PLA2G1A	Cobras and Kraits	~14	His/Asp	mM	N/A
	IB	PLA2G1B	Human/porcine pancreas	~14			Pancreatic acinar carcinoma [93], dry eye disease [94]
	IIA	PLA2G2A	Human synovial/ Rattlesnakes	~14			Arthritis, atherosclerosis, sepsis, cancer [20,23–25,95]
	IIB	PLA2G2B	Gaboon viper	~14			N/A
	IIC	PLA2G2C	Rat/murine testis	~14			N/A
	IID	PLA2G2D	Human/murine/ pancreas/spleen	~14			Chronic obstructive pulmonary disease [96], asthma [97]
	IIE	PLA2G2E	Human/murine/ brain/heart/uterus	~14			Ulcerative colitis [98], chronic rhinosinusitis [99]
	IIF	PLA2G2F	Human/murine/ testis/embryo	~14			Atopic dermatitis [100], colorectal cancer [101]
	III	PLA2G3	Lizard/bee/human/ murine	~55			Colorectal cancer [101], atherosclerosis [102]
	V	PLA2G5	Human/murine heart/lung/macrophage	~14			Arthritis, atherosclerosis, sepsis, cancer, chronic hepatitis [20,23–25]
	IX	PLA2G9	Metazoan	~14			N/A
	X	PLA2G10	Human spleen/thymus/ leukocyte	~17			Arthritis, atherosclerosis, sepsis, cancer [20,23–25]
	XIA	PLA2G11A	Green rice shoots	~13			N/A
	XIB	PLA2G11B	Green rice shoots	~13			N/A
	XIIA	PLA2G12A	Human/murine	~14			Kuhnt-Junius degeneration [103], malignant glioma [104]
	XIIB	PLA2G12B	Human/murine	~14			Acute pancreatitis [105]
	XIII	PLA2G13	Parvovirus	<10			N/A
	XIV	PLA2G14	Symbiotic fungus/ bacteria	13–19			N/A

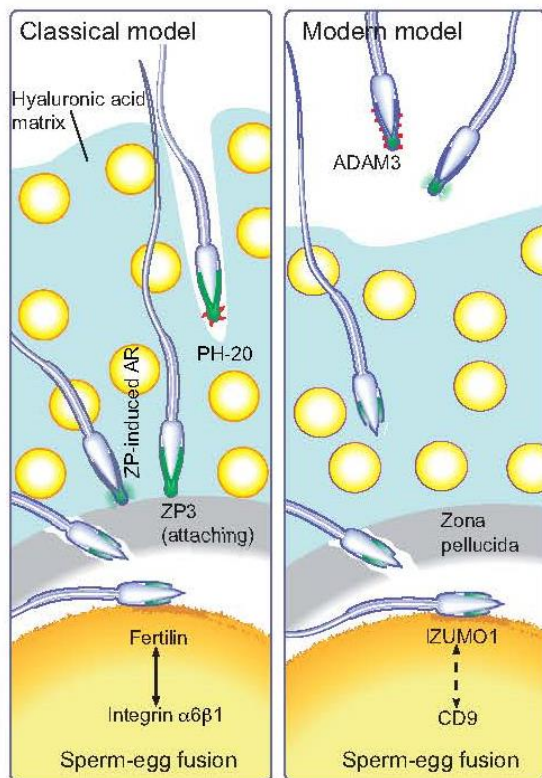
**Tableau 6:** les différents inhibiteurs de PLA2 utilisé couramment

Nom des inhibiteurs	Concentration en $\mu\text{M}$	Rôle
AZ1	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les cPLA2
BEL	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les iPLA2
FGKG	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les iPLA2
LY329722	1 $\mu\text{M}$	Inhibe les sPLA2
MAFP	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les cPLA2 et les iPLA2
Pyr-1	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les cPLA2
Pyr-2	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les cPLA2
U73122	10 $\mu\text{M}$	Inhibe les PLC
YM26734	1 $\mu\text{M}$	Inhibe les sPLA2



## 7. Chapitre 7 : La fécondation et le développement embryonnaire chez la souris

Pendant longtemps l'interaction gamétique a été assimilée à la seule étape de fusion des gamètes. Dans sa dernière revue de 2012, Janice Evans revient sur la nécessité de faire la distinction entre les deux étapes d'adhésion et de fusion (Evans, 2012) car l'adhésion, précédant la fusion, joue un rôle à part entière et essentiel dans le processus de fécondation. Par ailleurs, l'interaction entre ovocyte et spermatozoïde a longtemps été étudiée comme un phénomène impliquant des interactions uniquement entre les molécules des deux gamètes. Mais des études récentes ont montré que certaines molécules considérées comme impliquées ou même indispensables dans ces mécanismes d'adhésion et de fusion, interviennent également voire principalement à travers des interactions avec des partenaires sur la même membrane (**Fig 29**).



**Figure 29 : Mécanisme de la fécondation.** (Okabe, 2013).

La **figure 29** présente les 2 modèles de la fécondation : le nouveau et l'ancien modèle. Le schéma classique de la fécondation (à gauche) : les spermatozoïdes ont de l'hyaluronidase (PH-20, également connu sous le nom SPAM1) (triangles roses) sur leur surface, ils traversent le cumulus et s'attachent à la zone pellucide (ZP). De nombreuses protéines



spermatiques ont été envisagées pour la liaison à la zone pellucide. La seule molécule ZP3 qui appartienne à l'ovocyte est décrite pour faire la liaison primaire avec les spermatozoïdes ou « primary binding » et qui engendre une cascade moléculaire compliquée pour induire la réaction acrosomique. Le moment de la réaction de l'acrosome a également été proposé d'être important pour que le spermatozoïde puisse traverser la zone pellucide, car on croyait que les enzymes de l'acrosome (tels que l'acrosine) doivent être libérés lors de la liaison primaire. L'interaction de la protéine spermatique fertiline avec l'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  qui se trouve sur l'ovocyte a été également décrite qui a un rôle important lors de la fusion des gamètes. Cependant, aucune déficience de ces gènes chez les souris KO perturbe la fécondation (He et al., 2003). Dans le schéma moderne (à droite), le spermatozoïde traverse le cumulus avec ou sans l'acrosome. Les spermatozoïdes qui ont subi la réaction acrosomique peuvent traverser le cumulus et la zone pellucide pour une deuxième fois (Inoue et al., 2011). Bien que la liaison primaire ne soit pas nécessaire pour que le spermatozoïde puisse féconder un ovocyte mature, il est connu que la force de la liaison primaire est attribuée à ADAM3 (points roses) sur la surface des spermatozoïdes. Si le gène ADAM3 est muté les spermatozoïdes ne peuvent pas migrer dans l'oviducte et donc ils n'arrivent pas à aborder les ovocytes pour les féconder. Cependant, ADAM3 est un pseudogène chez l'homme (Grzmil et al., 2001). Par conséquent, s'il existe un mécanisme général pour la fécondation chez les mammifères, les chercheurs n'ont pas trouvé le facteur clé pour la réussite de ce dernier. Finalement ils ont montré le rôle essentiel d'IZUMO1 une protéine qui se trouve sur les spermatozoïdes et la tétraspanine (CD9) qui se trouve sur les ovocytes dans la fusion des gamètes mais le mécanisme reste encore peu connu et mal clarifié.

## *7.1.L'adhésion et la fusion dans l'interaction gamétique et les acteurs moléculaires*

### *7.1.1. L'adhésion cellulaire*

L'adhésion d'une cellule à une autre cellule ou à la matrice extracellulaire est fondamentale pour le développement tissulaire normal, les fonctions immunitaires, le développement embryonnaire et le processus de fécondation (Thiery, 2003). L'adhésion est assurée par un certain nombre de protéines dites « adhésives » qui sont les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les membres de la superfamille des immunoglobulines. Ce sont des protéines membranaires, souvent liées au cytosquelette et qui vont développer des interactions ligand-récepteur (Aricescu and Jones, 2007; Berditchevski and Odintsova, 1999; Finaz and Hammami-Hamza, 2000; Ruoslahti and Obrink, 1996). Dans le cadre de la fécondation, l'adhésion intervient quand le spermatozoïde ayant traversé la zone pellucide arrive au contact de la membrane cytoplasmique de l'ovocyte et adhère. L'évaluation de l'adhésion durant la fécondation est délicate. Le manque d'information concernant le processus d'adhésion des gamètes et la difficulté à caractériser cette étape de la fécondation par les techniques de biologie traditionnelles avait motivé l'équipe française d'Antoine Jégou en 2008 Université

paris VII à mettre au point une approche expérimentale issue de la physique permettant d'étudier spécifiquement l'adhésion entre un spermatozoïde et un ovocyte unique permettant de sonder directement et quantitativement l'adhésion entre les deux gamètes isolées, comme c'est le cas dans la nature. Antoine Jegou, a été montré que plusieurs types d'adhésion existaient entre le spermatozoïde et l'ovocyte, certaines efficaces pour la fusion, les autres non (Jegou et al., 2008; Jegou et al., 2011). Plusieurs protéines sont impliquées dans ce processus. Ces protéines sont présentes au niveau de la zone antérieure sur la membrane interne de ce qui fut l'acrosome et au niveau de la zone équatoriale. C'est au niveau de cette région que l'adhésion conduisant à la fusion aura lieu (Fujihara et al., 2010; Gadella, 2008; Satouh et al., 2012; Vjugina et al., 2009).

### *7.1.2. La fusion cellulaire*

La fusion membranaire est le processus par lequel deux bicouches lipidiques vont fusionner et créer l'union de deux compartiments distincts. Dans le cas de la fécondation la fusion cellulaire est hétérotypique (deux cellules différentes), le début de la fusion se traduit par l'arrêt de l'hyperactivité (arrêt du battement du flagelle) du spermatozoïde. La fusion débute au niveau de la zone équatoriale, puis la région antérieure de la tête (recouverte par la membrane interne de l'acrosome) est internalisée par un mécanisme très proche de la phagocytose (Bronson, 1998). Les expériences de fécondation in-vitro permettant de tester les protéines impliquées dans l'interaction gamétique ne permettent le plus souvent pas de discriminer celles jouant un rôle dans l'adhésion précédant la fusion de celles intervenant directement dans la fusion. Les mécanismes biochimiques associés à ces deux étapes sont mal connus. Des équipes ont décrit des échanges membranaires et protéiques entre l'ovocyte et le spermatozoïde et ce dès l'arrivée du spermatozoïde dans l'espace périvitellin avant même qu'il y ait fusion entre les membranes. Néanmoins, le rôle joué par ces échanges dans la fécondation reste à élucider (Barraud-Lange et al., 2007).

### *7.2. Les acteurs protéiques impliqués dans l'interaction gamétique*

Un nombre important de molécules ont été identifiées, ces dernières années, comme jouant un rôle dans l'interaction gamétique (Inoue et al., 2011; Rubinstein et al., 2006a; Rubinstein et al., 2006b). La détermination des molécules candidates a débuté par l'utilisation des anticorps bloquants lors d'expériences de fécondation in-vitro. Plus récemment les travaux de protéomique ont permis, en plus d'identifier d'autres molécules (Nishimura et al., 2001; Stein et al., 2006; Wolkowicz et al., 2008). Cette partie sera consacrée à la description des principales protéines et familles de protéines impliquées dans l'interaction spermatozoïde ovocyte en mettant en avant leur rôle dans l'interaction gamétique.

### **7.2.1. Les acteurs ovocytaires**

#### **7.2.1.1. La famille des tétraspanines**

Les tétraspanines constituent une famille de protéines, identifiées en premier sur les leucocytes humains (Hotta et al. 1988; Classon BJ et al. 1990; Classon et al. 1989), largement présentes dans différents organismes.. Elles sont également exprimées par différents tissus et impliquées dans de nombreux processus cellulaires importants : migration, adhésion, fusion, signalisation cellulaire, réponse immunitaire et processus métastatiques (Charrin et al., 2009; Hemler, 2014; Maecker et al., 1997; Sala-Valdes et al., 2012). Les mécanismes par lesquels elles agissent ne sont pas complètement élucidés. Une caractéristique largement décrite est leur capacité à interagir entre elles et avec d'autres protéines membranaires. Elles induisent la formation de complexes multi-protéiques dynamiques appelés « tetraspanin web » ou toile tétraspanine (Yanez-Mo et al., 2009). Les principaux partenaires rapportés sont les intégrines (Berditchevski, 2001; Berditchevski and Odintsova, 1999; Gutierrez-Lopez et al., 2003; Ray and Treloar, 2012; Ziyyat et al., 2006) mais également des protéines de la superfamille des immunoglobulines (Charrin et al., 2003; He et al., 2009; Le Naour et al., 2004).

##### **7.2.1.1. Les tétraspanines : CD9 et CD81**

Nous décrirons plus particulièrement les tétraspanines CD9 et CD81 car ce sont les plus impliquées dans le processus d'interaction gamétique.

Le CD9 est impliqué dans les processus fusionnels lors de la fécondation. La première preuve a été expérimentale : l'anticorps monoclonal JF9 dirigé contre CD9 inhibe la fusion gamétique (Chen et al., 1999). Le phénotype majeur observé sur des souris KO pour cette protéine est une forte réduction de la fertilité des femelles (chute de plus de 95% du taux de fécondation) causée par un défaut de fusion des gamètes. . Lors d'expériences de fécondation in-vitro, les spermatozoïdes adhèrent à l'ovocyte CD9<sup>-/-</sup> mais ne peuvent pas fusionner. En revanche, en s'affranchissant de cette étape de fusion en injectant un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte CD9<sup>-/-</sup>, le processus de fécondation peut se poursuivre (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Ziyyat et al., 2006). Les souris KO pour CD81 présentent également un défaut de fertilité, moins sévère cependant que celui observé pour CD9. Ces souris ont des taux de fertilités de 40% inférieurs à la normale (Rubinstein et al., 2006a). Le double KO CD9 et CD81 est quant à lui complètement stérile suggérant une interaction entre ces deux protéines (Rubinstein et al., 2006a; Ziyyat et al., 2006). Mais cette question est encore sujette à débat et a été dernièrement contredite par l'équipe de Miyado (Ohnami et al., 2012).

##### **7.2.1.2. Les Intégrines**

#### ***7.2.1.2.1. Rôle des intégrines dans la fécondation***

Les intégrines sont une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans les processus d'adhésion (Bowen and Hunt, 2000). Leur rôle dans l'interaction gamétique a été rapporté en 1995 par une équipe, qui a identifié l'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  lors d'expériences d'inhibition de FIV par l'anticorps GoH3 (Evans et al., 1997). L'intérêt pour cette famille de protéines a augmenté lors de travaux ultérieurs qui ont montré leur interactions avec les protéines de la famille des ADAMs notamment ADAM2 portées par la membrane spermatique (Evans et al., 1997; Tarone et al., 1993). L'équipe de Barraud-Lange ont montré que l'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  était également présente à la surface du spermatozoïde (Barraud-Lange et al., 2007). Toutefois, les travaux sur animaux transgéniques portant sur les invalidations de gènes pour ces protéines de la membrane ovocytaire ont ensuite montré que les lignées KO pour différentes intégrines sont fertiles (Bayas et al., 2007; Evans et al., 1997; He et al., 2003; Sengoku et al., 2004).

#### ***7.2.1.2.2. Les Ancres membranaires : GPI-anchored proteins***

Les ancras GPI sont des protéines « ancrées » à la membrane plasmique grâce à un glycolipide : le glycosyl-phosphatidylinositol. Le rôle actif de la Glycosyl Phosphatidylinositol– Anchored Protein (GPI-APS dans l'interaction gamétique a été découvert lors d'expériences de fécondation in-vitro menées en présence de phosphatidylinositol phospholipase C (PI-PLC). Cette molécule clive les GPI-anchored proteins. Les spermatozoïdes mis en présence d'ovocytes ayant subi ce traitement adhèrent à la membrane plasmique de l'ovocyte mais ne fusionnent pas (Coonrod et al., 1999). La génération de lignées délétées de ces protéines uniquement dans l'ovocyte montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin sans fusionner. Les expériences de fécondation in-vitro menées avec cette lignée montrent un taux de fécondation diminué de 90% et un taux d'adhésion diminué de 40% (Alfieri et al., 2003).

### ***7.2.2. Les acteurs spermatiques***

#### ***7.2.2.1. La famille des ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease)***

La famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease), est une famille de protéines transmembranaires caractérisée initialement grâce à des études d'analogie avec des métalloprotéases contenues dans le venin de serpent. Les premières ADAMs de mammifères ont été découvertes à la surface de spermatozoïdes de cochon d'inde (Primakoff et al., 1987; Wolfsberg and White, 1996). Cette famille de protéines a été appelée ainsi car ses membres possèdent tous un domaine « métalloprotéase » et un domaine « désintégrine ».

#### ***7.2.2.1.1. Rôle des ADAMs dans l'interaction gamétique***

- La fertiline ou le complexe ADAM1/ADAM2 La fertiline ou complexe PH-30 est constituée de deux sous-unités: la fertiline  $\alpha$  dite ADAM1 et la fertiline  $\beta$  dite ADAM2 (Blobel et al., 1992; Primakoff et al., 1987; Wolfsberg and White, 1996). La génération de souris ko pour la fertiline  $\beta$  a révélé différentes anomalies fonctionnelles, une chute importante du taux de fécondation mais pas de stérilité complète (Nishimura et al., 2001).
- La Cyristetine ADAM3 Les expériences d'inhibition de la fécondation in-vitro ont montré qu'en bloquant le domaine désintégrine d'ADAM3 on observait 80% de baisse du taux d'adhésion et 90% de baisse du taux de fusion (Yuan et al., 1997). De même, les animaux transgéniques délétés pour la Cyristetine ne montrent pas de stérilité totale. Cette protéine semble être impliquée dans le processus d'adhésion du spermatozoïde avec la zone pellucide et non avec la membrane plasmique ovocytaire (Nishimura et al., 2001). Les protéines de la famille des ADAMs ont pendant longtemps été considérées comme des protéines jouant un rôle clé dans l'interaction gamétique. Mais l'apport des travaux sur les lignées transgéniques KO a montré que bien qu'elles semblent jouer un rôle important dans l'interaction gamétique leur absence n'entraîne pas de stérilité totale. Leur rôle dans l'adhésion/fusion n'est pas complètement élucidé.

#### ***7.2.2.1.2. SPESP1 (Sperm Equatorial Segment Protein)***

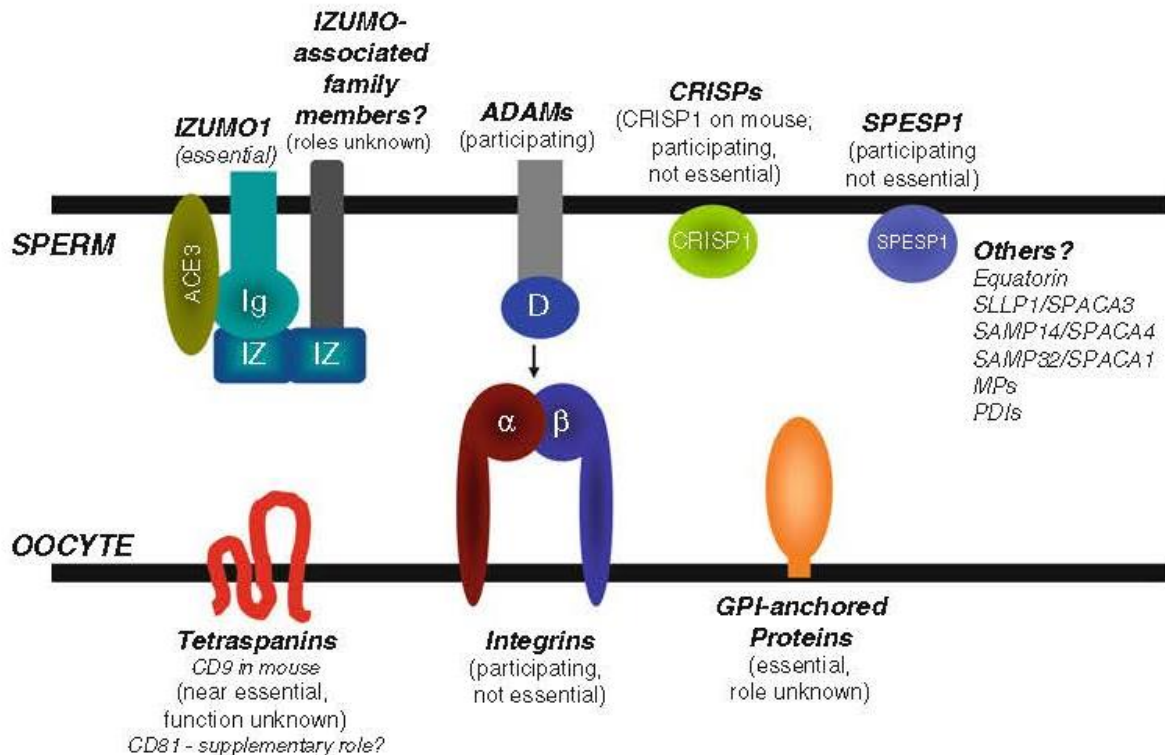
SPESP1 est une protéine de la région équatoriale et demeure intacte après la réaction acrosomique (Wolkowicz et al., 2008). Les anticorps dirigés contre cette protéine inhibent la fusion entre les spermatozoïdes humains et les ovocytes de hamster. Les spermatozoïdes issus de la lignée KO pour cette protéine montrent une baisse importante du taux de fécondation par défaut de fusion (Fujihara et al., 2010).

#### ***7.2.2.1.3. Izumo1 est une protéine clé de la fécondation***

Izumo est une protéine de la tête spermatique (Ellerman et al., 2009; Inoue et al., 2005) a été identifiée comme partenaire protéique de la fusion gamétique, il s'agit d'une protéine membranaire, appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle est spécifique du spermatozoïde et comporte une petite région extracellulaire. Cependant, à l'inverse des autres membres de la famille, celle-ci ne contient qu'un seul domaine Ig-like, dont on connaît la capacité de relayer l'adhérence intercellulaire, et permettant un contact plus étroit avec la membrane ovocytaire (**Fig.30**). Les souris mâles dépourvues d'Izumo sont stériles, les spermatozoïdes se lient à la membrane de l'ovocyte sans pouvoir fusionner.

Au cours de la réaction acrosomique Izumo1 subit une relocalisation sur la membrane plasmique où elle devient donc exposée à l'environnement. Izumo1 se répand alors sur l'ensemble de la tête et montre une tendance à se rassembler au niveau de la zone équatoriale (Satouh et al., 2012). La relocalisation d'Izumo1 est associée à une sérine kinase spécifique du testicule (TssK6). La génération d'une lignée de souris transgénique délétée de cette kinase montre qu'elle est nécessaire à la relocalisation d'Izumo1 au moment de la réaction acrosomique

L'équipe d'Okabe confirme le caractère indispensable d'Izumo1 dans l'interaction gamétique en générant par recombinaison homologe une lignée de souris Izumo<sup>-/-</sup>. Les femelles de cette lignée sont normalement fertiles, alors que les mâles délétés en Izumo1 sont totalement stériles. En dépit d'un comportement sexuel standard et de spermatozoïdes de morphologie et motilité normales, l'analyse des ovocytes prélevés chez des femelles sauvages 24 heures après accouplement avec un mâle Izumo1<sup>-/-</sup> montre que les spermatozoïdes s'accumulent dans l'espace périvitellin, adhèrent à la membrane ovocytaire mais ne peuvent fusionner (Inoue et al., 2005). La même observation est faite en réalisant in vitro des inséminations d'ovocytes dépellucidés par des spermatozoïdes Izumo1<sup>-/-</sup>. En revanche, en court-circuitant l'étape de fusion grâce à l'injection d'un spermatozoïde Izumo<sup>-/-</sup> directement dans le cytoplasme d'un ovocyte sauvage, la fécondation se poursuit normalement donnant naissance à des portées viables présentant les caractéristiques mendéliennes classiques. Les spermatozoïdes Izumo<sup>-/-</sup> semblent donc capables de traverser toute les étapes de la fécondation exceptée celle de la fusion et les portées engendrées sont menées à terme donnant naissance à des individus normaux. L'induction d'Izumo dans les spermatozoïdes Izumo<sup>-/-</sup> restaure totalement la fertilité.



**Figure 30 : Schéma récapitulatif des principaux acteurs protéiques**

Sur le spermatozoïde **Izumo1** : Seule protéine de la membrane spermatique dont l'absence entraîne une stérilité totale. 2. Les protéines de la famille ADAM : ADAM1 et ADAM2 développent des liaisons en trans avec l'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  ovocytaire. La génération de lignées transgéniques montre un défaut de stérilité mais pas de stérilité totale. **SPESP1** (Sperm Equatorial Segment Protein) : Exprimée au niveau de la zone équatoriale du spermatozoïde et colocalise avec Izumo1. Les spermatozoïdes issus de la lignée KO pour cette protéine montrent un défaut de fusion.

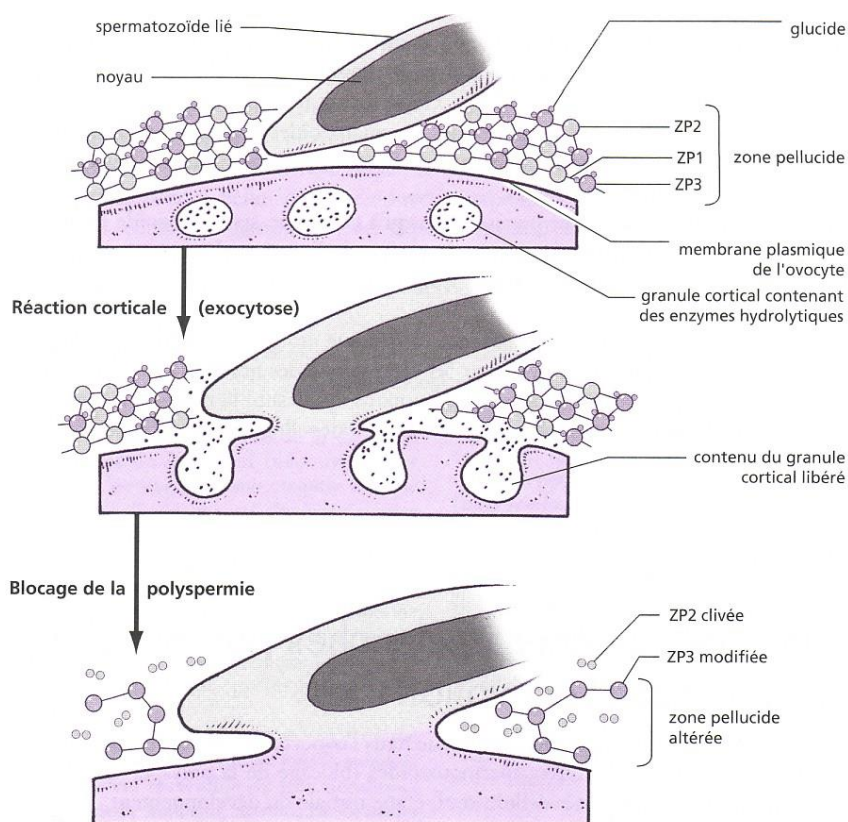
Sur l'ovocyte **La tétraspanine CD9** est une protéine cruciale de l'interaction gamétique. Son absence entraîne une baisse importante de la fertilité. Les spermatozoïdes sauvages adhèrent à l'ovocyte CD9 KO mais ne peuvent fusionner. 2. Les intégrines : protéines récepteurs des ADAMs et partenaires des tétraspanines. Sont également présentes à la surface des spermatozoïdes. L'invalidation des gènes pour ces protéines ne montrent pas d'infertilité. **Les GPI-Anchored Protein (GPI-APS)**, ou ancres membranaires. Elles sont impliquées dans les processus de fusion. Les spermatozoïdes féconds des ovocytes délétés pour le gène s'accumulent dans l'espace périvitellin sans fusionner. (Gadella and Evans, 2011)

### 7.3. Réaction corticale de l'ovocyte fécondé

Quelques secondes après la pénétration du spermatozoïde, des phénomènes se manifestent au niveau de la membrane, qui engendreront non seulement une activation des processus métaboliques dans l'ovocyte mais aussi l'établissement de barrières contre la polyspermie. Les pénétrations multiples de spermatozoïdes seront évitées grâce à deux mécanismes : l'un rapide, par une modification du potentiel de membrane, l'autre plus lent, par l'exocytose dans l'espace périvitellin de granules corticaux qui sont des organites riches en enzymes. Ces derniers diffusent alors vers la zone pellucide et y modifient les glycoprotéines ZP3,



probablement en modifiant spécifiquement les O-oligosaccharides (**Fig 31**), ce qui cause le détachement des gamètes mâles et empêche toute nouvelle fixation (Gahlay et al., 2010).



**Figure 31 : La réaction corticale chez la souris :** Un autre mécanisme va assurer la protection contre la polyspermie : la réaction corticale de l'œuf la fusion des deux gamètes, cause une augmentation locale du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique qui s'étend dans la cellule comme une vague calcique qui va activer l'œuf et va initier la réaction corticale, au cours de laquelle les granules corticaux libèrent leur contenu (différents enzymes) par exocytose dans l'espace périvitellin. Ces enzymes contenues dans les granules corticaux une fois libérées, changent la structure de la ZP et la rendent impénétrable par les autres spermatozoïdes Parmi ces changement de la ZP est le clivage protéolytique de ZP2 et l'hydrolyse du groupement sucres de ZP3

#### 7.4.Activation ovocytaire

La plupart des chercheurs considèrent l'activation ovocytaire comme le moment du démarrage du cycle cellulaire de l'ovocyte. L'activation ovocytaire comprend tous les événements compris entre les premiers événements cellulaires de la sortie de métaphase et la formation des pro-noyaux (expulsion des granules corticaux, séparation des chromatides métaphasiques, décondensation des chromosomes, remodelage de la chromatine et formation des pro-noyaux). L'activation ovocytaire est nécessaire pour déclencher le développement embryonnaire. Les ovocytes de mammifères après ovulation se trouvent dans la deuxième métaphase de la méiose (MII). Sans activation, l'ovocyte reste bloqué à ce stade et après un certain temps et selon l'espèce, il meurt. Pour cette cellule très spécifique, la seule possibilité



d'exprimer sa totipotence et de survivre est l'activation, par un spermatozoïde par exemple, qui le transforme en un embryon capable de se développer.

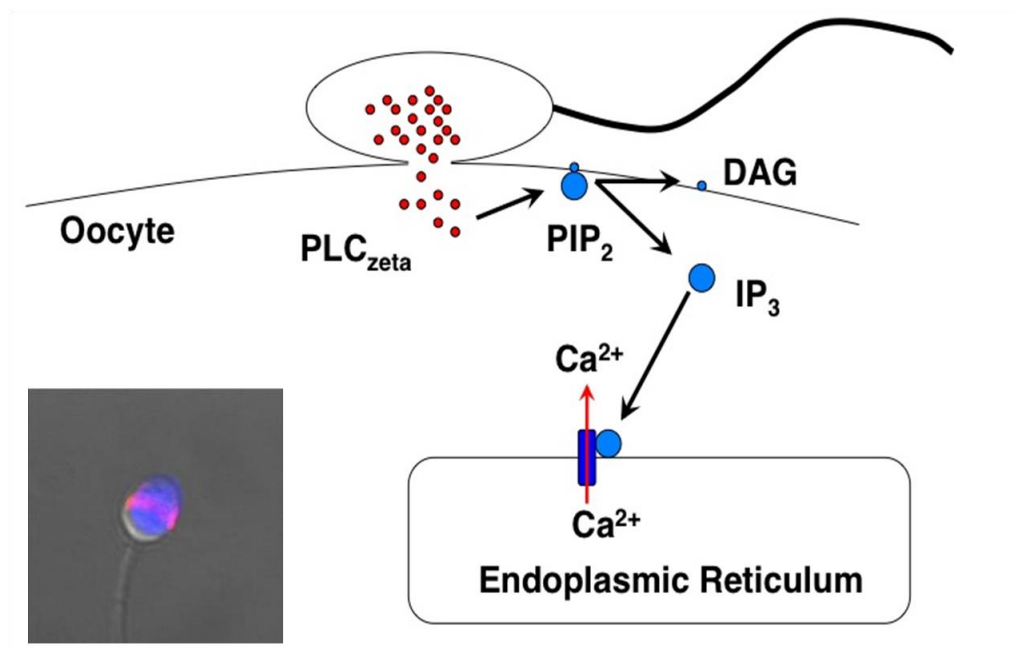
#### *7.4.1. Le calcium, inducteur ou organisateur des événements de l'activation*

La fécondation initie une oscillation soutenue de  $[Ca^{2+}]_i$  qui déclenche une séquence d'événements cellulaires dans l'ovocyte, qui se déroulent selon un ordre précis (Saunders et al., 2002). En effet, après la fécondation des glycoprotéines (ZP2 et ZP3, composant la zone pellucide) sont modifiées. En conséquence, le spermatozoïde ne peut plus ni se fixer, ni subir la réaction acrosomique (Bleil and Wassarman, 1980; Bleil and Wassarman, 1983). L'augmentation intense du  $[Ca^{2+}]_i$  induit également la reprise de la méiose par le remaniement complet de l'activité du système phosphorylase-kinase d'ovocyte. Une élévation importante du niveau de  $Ca^{2+}$  intracytoplasmique déclenche les cascades d'activation ou d'inactivation des éléments du système phosphorylase - kinase dans le but d'achever la méiose et de commencer le premier cycle cellulaire. Il est actuellement admis que l'oscillation calcique lors de la fécondation est induite par la phospholipase C du spermatozoïde (PLC $\zeta$ ) qui favorise l'hydrolyse du biphosphate de phosphatidylinositol (PIP2) et la production d'IP3. L'augmentation de la concentration cytoplasmique d'IP3 provoque le changement conformationnel de l'IP3R et l'activation du CICR (Calcium Induced Calcium Release), libération de  $Ca^{2+}$  induite par le  $Ca^{2+}$  (Berridge and Irvine, 1984; Berridge and Irvine, 1989; Parrington et al., 1999; Rice et al., 2000; Saunders et al., 2002). D'autre part, la signalisation  $Ca^{2+}$  à la fécondation de l'oeuf d'oursin peut également impliquer le CICR par les récepteurs ryanodine. La liaison d'IP3 et du  $Ca^{2+}$  aux récepteurs situés sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE) induit la déplétion de  $Ca^{2+}$  (**Fig 32**).

Le signal généré par cette diminution de concentration de  $Ca^{2+}$  dans le RE provoque une interaction encore mal connue entre la membrane plasmique et le RE (à travers les récepteurs SOC, les canaux dirigés par les réserves de  $Ca^{2+}$ ) qui est responsable du réapprovisionnement du stock de  $Ca^{2+}$  du RE (Bird et al., 1993; Putney et al., 2001). Finalement, nous pouvons tirer la conclusion suivante, dans la libération du  $Ca^{2+}$  deux processus principaux sont impliqués : la sensibilisation des canaux calciques (surtout l'IP3R) et la concentration du  $Ca^{2+}$  dans le cytosol et les réservoirs. L'altération de l'un ou de l'autre peut modifier la régulation de  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### *7.4.2. Amphimixie et déclenchement du développement embryonnaire*

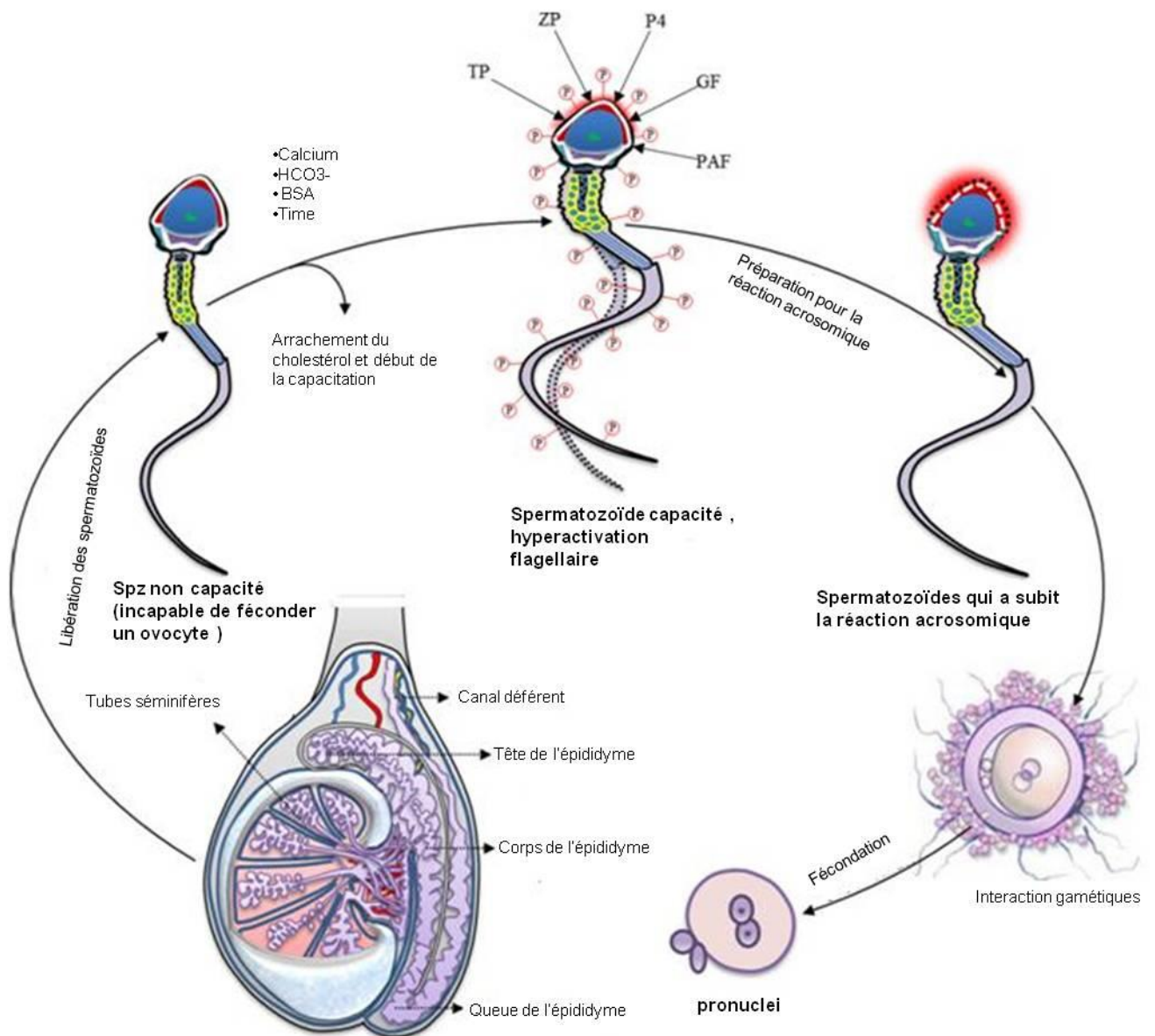
Il s'agit de la fusion des deux pronuclei. En réalité, les deux pronuclei ne se fusionnent pas à proprement parler, comme on pourrait l'imaginer, mais le matériel génétique se rassemble sur la plaque équatoriale au moment de l'anaphase de la première division cellulaire du zygote (**Fig 32**).



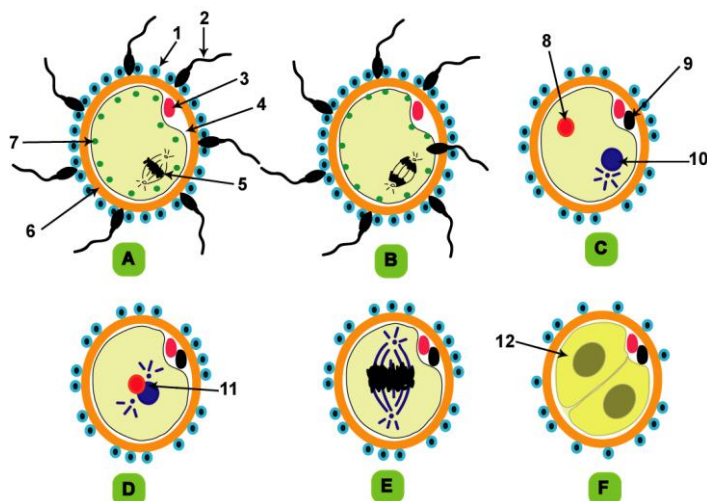
**Figure 32 :** Après la fusion de la membrane du spermatozoïde avec celle de l'ovocyte, le zygote est activé. La PLC $\zeta$  va hydrolyser les lipides PIP $_2$  présents dans la membrane plasmique de l'ovocyte et produire de l'IP $_3$  responsable de la mobilisation du calcium contenu dans les stocks calciques intracellulaire. Sur la photo en bas à gauche on voit en rouge le marquage de la PLC zêta 1 sur la région équatoriale du spermatozoïde humain. (D'après <http://www.ansci.wisc.edu> adaptée)

### Conclusion :

Le mécanisme de la fécondation a été bien décrit, cependant la nouvelle théorie de la fécondation qui dit « qu'un spermatozoïde réagit peut féconder un ovocyte pour donner des embryons viables, et que le mécanisme de la fécondation ne passe pas seulement par la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide, mais d'une interaction gamétique spécifique et compliqué » a pris la place de l'ancienne théorie (théorie classique) qui dit que la fécondation passe la fixation du spermatozoïde sur la zone pellucide. Vous trouverez ci-dessous deux figures sur les différents mécanismes physiologiques (**Fig. 33 et 34**) pour aboutir à la fin à un embryon. Ces 2 schémas seront utiles à la compréhension des résultats présentés.



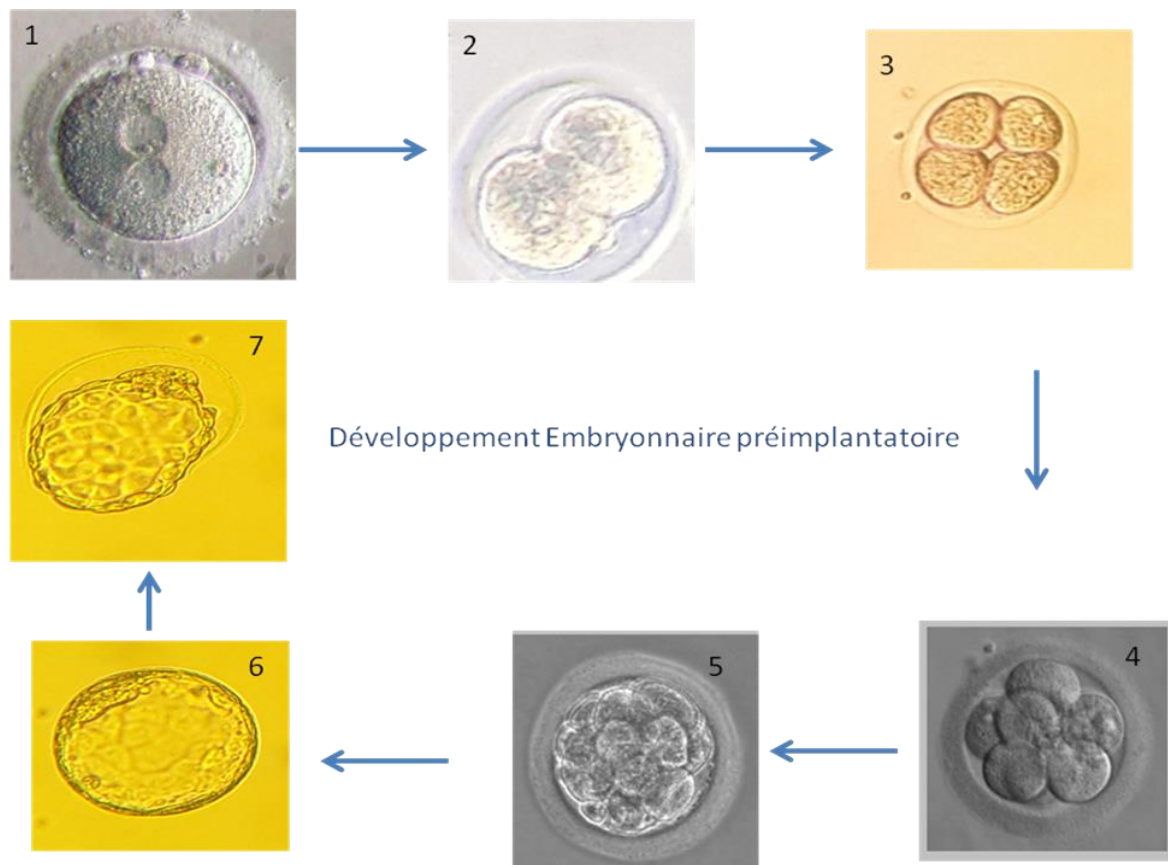
**Figure 33 :** Schéma qui nous rappelle des différentes étapes de changement physiologique (capacitation, réaction acrosomique et l'interaction gamétiques) qui permettent d'avoir un spermatozoïde mature capable de féconder un ovocyte pour donner un embryon.



**Figure 34 : Schéma qui résume les grandes étapes de la fécondation :** 1: cellule folliculaire de la corona radiata, 2: Spermatozoïde, 3: 1er globule polaire, 4: espace péri-ovocytaire, 5: matériel nucléaire bloqué en métaphase II, 6: zone pellucide, 7: granule cortical, 8: pronucléus femelle, 9: 2ème globule polaire, 10: pronucléus mâle, 11: noyau diploïde, 12: blastomère (cellule embryonnaire) **A:** L'ovocyte II bloqué en métaphase II. **B et C:** Après une réaction, un ou plusieurs spermatozoïdes peuvent franchir la zone pellucide. Un seul spermatozoïde se fixe sur les récepteurs spécifiques localisés à la surface de la zone pellucide. Les membranes de deux gamètes fusionnent et le noyau du spermatozoïde est injecté dans le cytoplasme de l'ovocyte II. **D:** Les deux pronucléus mâle et femelle se rapprochent l'un de l'autre et finissent par fusionner. **E et F:** Le zygote subit sa première mitose pour donner un embryon formé de deux blastomères (stade 2 cellules)

### *7.5. Rappel du timing du développement embryonnaire pré-implantatoire de la souris (0-4 jours)*

Résultat de la fécondation, l'œuf, commence immédiatement à se diviser par mitose. La première division a lieu dans les trente heures suivant la fécondation, aboutissant à deux cellules filles. La segmentation est une série de divisions mitotiques en succession rapide, qui mène à la formation du blastocyste au 3.5 jour de gestation. Le blastocyste final n'est composé que de deux lignées cellulaires, la masse cellulaire interne (MCI) excentrique, totalement indifférenciée (dont dérivera ultérieurement l'embryon proprement dit) et un cylindre externe de cellules trophoblastiques, le trophoctoderme situé à l'opposé de la masse cellulaire interne (MCI) (**Fig.35**), véritable épithélium qui assurera l'interaction avec l'épithélium utérin. Il contient également une cavité appelée blastocoele, le futur sac vitellin, (Paria et al., 1999). une fois l'embryon s'écoule l'étape de la nidation et le développement intra-utérin commence, la durée de gestation chez la souris est de 3 semaines. (**Tableau 7**)



**Figure 35 : Développement pré - implantatoire de l'embryon de souris : 1 : stade pro-noyaux, 2 : stade 2 cellules. 3 : stade 4 cellules, 4 : morula, 5 : morula compact, 6 : blastocyste et 7 : éclosion de l'embryon**

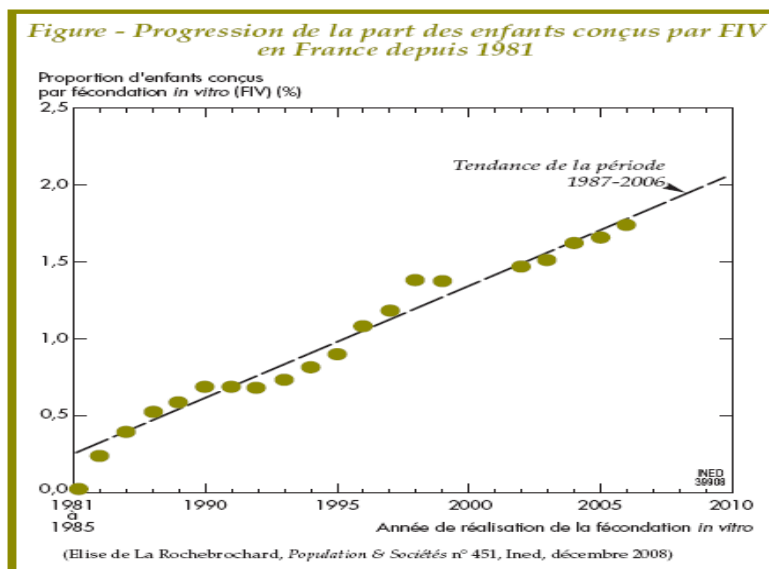
**Tableau 7 :** Etapes majeures du développement embryonnaire pré-implantatoire et intra-utérin chez la souris. Adapté (Cross et al., 1994)

<b>Jour de gestation</b>	<b>Evénement</b>
J 0	<b>La fécondation</b>
6 h	<b>2 pro-noyaux</b>
24 h	<b>2 cellules</b>
J 2	<b>4 cellules</b>
J3	<b>Morula</b>
3.5	<b>Formation du blastocyste</b>
4.25 à 4.5	<b>Activation du blastocyste</b>
4.5 à 6	<b>Implantation</b>
6 à 8	<b>Formation du sac vitellin</b>
9 à 10	<b>Développement du placenta chorioallantoïde</b>
8 à 18	<b>Développement de la vascularisation fœtale</b>
20 à 21	<b>Mise bas</b>



## 8. Problématique et Objectifs

Les techniques de procréation médicalement assistée (PMA) sont aujourd'hui largement utilisées, avec près de 2% d'enfants conçus grâce à une assistance médicale à la procréation. Malgré ces progrès indéniables, de nombreux couples infertiles ne parviennent pas à avoir d'enfant. De manière générale, le taux de succès des techniques de PMA est faible, et il y a un réel besoin d'amélioration de ces techniques, afin d'augmenter le taux de succès final. Au cours de la dernière décennie, le recours à l'aide à la procréation a été multiplié par deux (**Fig 36**), sans que le taux de succès n'ait été amélioré, montrant l'absence de rupture technologique au cours de cette période dans le domaine de la reproduction.



**Figure 36 :** Graphe montrant l'augmentation de la demande sur les techniques de PMA : 200 000 enfants sont nés par FIV depuis que la technique existe (soit 30 ans). En 2006 : plus de 20 000 enfants sont nés après une AMP, ce qui représente 2,4 % des naissances enregistrées en France par l'INSEE la même année

Dans l'introduction j'ai détaillé les différentes étapes de la physiologie spermatique que sont la capacitation, l'hyperactivation flagellaire, la réaction acrosomique et la fusion gamétique. Dans chacune de ces étapes, nécessaires à la fécondation en condition naturelle, interviennent des phospholipases (**Voir chapitre 6**). Ces enzymes sont impliquées dans de multiples voies de signalisation, qui sont centrales dans les différentes étapes de la physiologie spermatique. L'équipe de Dr Christophe Arnoult a montré qu'une phospholipase particulière, présente au sein même des spermatozoïdes et relâchée au cours d'un processus d'exocytose pendant la capacitation, est capable d'éliminer une partie des spermatozoïdes subfertiles chez la souris (médecine et science). Le traitement pharmacologique des spermatozoïdes avec cette enzyme



permet d'augmenter significativement le taux de fécondation et favorise un développement embryonnaire normal. Ces travaux ont été publiés dans *Journal of Clinical Investigation* et une demande de brevet intitulée « Fertilization modulation compounds & process for implementing them » a été déposée en priorité européenne puis étendue à l'international pour protéger l'utilisation de ce type de molécules ou de ses métabolites.

L'objectif de ma thèse est de comprendre les mécanismes d'action des PLA2 et les voies de signalisation-régulation en mis en œuvre afin de proposer les sPLA2 dans l'arsenal thérapeutique de l'AMP. Cependant plusieurs étapes importantes dans la validation de ces molécules comme agents profertilité restent à franchir. Un des points important concerne la compréhension des voies moléculaires entre hydrolyse des phospholipides et amélioration du taux d'embryons clivés 24 heures après fécondation. Dans ce contexte, une des questions centrale concerne l'importance de la réaction acrosomique induite par la sPLA2 de groupe X dans l'augmentation du taux d'embryon. A l'heure actuelle, il est classiquement décrit que les spermatozoïdes ayant réalisés leur réaction acrosomique ne peuvent plus participer à la fécondation, et cela pour deux raisons. Premièrement, les récepteurs à la zone pellucide (ZP) seraient localisés dans la partie dorsale du spermatozoïde en regard de l'acrosome. Après la RA, cette partie de la membrane plasmique a disparu et l'interaction avec la ZP ne peut donc plus se produire. Deuxièmement, les enzymes libérées par les spermatozoïdes sont nécessaires à leur traversée à travers la zone pellucide. Si on s'en tient à cette vision classique, tous les spermatozoïdes ayant réalisé leur réaction acrosomique ne peuvent plus participer à la fécondation et la sPLA2 favorise donc leur élimination. Cependant, au cours de l'année 2011, deux articles ont chamboulé cette vision classique en montrant :

- que la majorité des spermatozoïdes qui traversent la ZP ont en fait réalisé leur RA au niveau du cumulus oophorus (Inoue et al., 2011; Jin et al., 2011).
- que des spermatozoïdes ayant déjà traversé la ZP et prélevés entre la membrane plasmique de l'ovocyte et la ZP pouvaient de nouveau retraverser la ZP d'ovocytes non fécondés.

Ces résultats suggèrent donc fortement que les spermatozoïdes ayant déjà réalisé leur RA ont une plus grande facilité à traverser la ZP et donc à féconder les ovocytes. D'après les résultats présentés par ces auteurs, il est donc possible d'interpréter l'effet potentialisateur des sPLA2 par une augmentation du nombre de spermatozoïdes aptes à traverser la ZP et in fine à féconder les ovocytes.

L'objectif de ma thèse est de montrer l'importance et le rôle crucial de la famille des PLA2 dans différents mécanismes de la reproduction, comme la réaction acrosomique, la fécondation et le développement embryonnaire pré-implantatoire. Afin de proposer cette molécule comme agent profertilité qui augmente le rendement des techniques de PMA.



# Article 1

## Introduction + objectif de l'article

La composition de la membrane plasmique des spermatozoïdes change profondément au cours de leur maturation. Plusieurs familles d'enzymes lipolytiques sont concernées par le remodelage lipidique. Parmi ces enzymes, les phospholipases A2 (PLA2) sont abondamment exprimées dans les organes reproducteurs mâles, le sperme éjaculé et dans le tractus génital femelle et jouent des rôles importants dans la capacitation, la réaction acrosomique (RA) et la fécondation. Nous avons montré au laboratoire que la PLA2 sécrétée de groupe X (mGX) est présente dans l'acrosome de souris, est relâchée au cours de la RA et est un inducteur de la RA. De plus, au cours d'une fécondation in vitro (FIV), nous avons montré que le traitement des spermatozoïdes par l'enzyme recombinante mGX améliore le taux d'embryons obtenus à 24 heures. Les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant inconnus. Cet effet pourrait être lié à l'augmentation importante des spermatozoïdes ayant réalisé leur RA après le traitement par mGX. Afin d'évaluer le rôle de la RA sur l'effet de mGX dans la FIV, nous avons déterminé l'efficacité sur la RA de différentes de sPLA2 humaines et murines, puis comparé le taux d'embryons murins à 24 h obtenus avec des spermatozoïdes traités avec différentes sPLA2. Compte tenu de ces nouvelles données, l'objectif de cet article était de réévaluer l'hypothèse initiale (élimination par RA anticipée, sous l'action de sPLA2, de spermatozoïdes inaptes à la fécondation) afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la sPLA2-X au cours de la fécondation. Pour cela, nous avons comparé le taux de succès en fécondation in vitro de deux activateurs de la RA qui sont la mGX (sPLA2 de groupe X murine) et la progestérone (P4).

## Résultats et discussion

Nous avons montré que la réaction acrosomique induite par mGX est supérieure à celle induite par P4. L'action combinée de mGX et P4 n'est pas significativement différente de celle de mGX seule. De plus, puisque la différence entre P4 et mGX ou P4 et action combinée est significative, cet effet est donc dû principalement à l'action de mGX et non à P4. Ceci montre que l'effet de P4 est masqué par mGX lorsque ces deux composés sont mis ensemble aux concentrations utilisées. Ainsi, la progestérone induit la réaction acrosomique mais elle ne génère pas un effet additif en présence de mGX. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que P4 et mGX activent des voies de signalisation différentes. En effet, il a été montré que P4 active via son récepteur non génomique une PLA2 endogène et une PLC. Il y a donc une possibilité que la progestérone induise la réaction acrosomique des spermatozoïdes murins, en activant une PLA2 endogène. Ainsi mGX pourrait utiliser une voie plus courte que celle de P4 et de cette manière augmenter la boucle d'amplification de la réaction acrosomique spontanée chez la souris.

En 3ème point, nous avons observé en FIV une augmentation significative du taux de clivage avec mGX, ce qui est en adéquation avec les résultats antérieurs publiés par l'équipe. Par contre, nous n'avons pas trouvé cette amélioration du taux de clivage lorsque les spermatozoïdes sont traités par P4 seule ou P4 combinée à mGX. Donc P4 seule ou combinée

à mGX induit un fort taux de RA mais n'améliore pas le taux de fécondation. L'effet des phospholipases A2 humaines et murines sur la RA des spermatozoïdes murins, montre que les sPLA2 hGV, hGX et mGIIA ont une efficacité similaire à mGX. Par contre mGIID est inactive. L'utilisation de ces mêmes phospholipases A2 humaines et de souris en FIV souris montre qu'aucune des sPLA2 testées (hGV, hGX, mGIIA, mGIID) ne mime l'effet positif de la mGX.

Si l'effet de mGX sur la fécondation était une élimination des spermatozoïdes peu féconds par l'activation précoce de leur RA, il n'y aurait pas de raison d'avoir un résultat différent en FIV que ce soit avec ou sans P4. Donc, l'hypothèse initiale émise par notre équipe sur la séquence obligatoire RA et interaction gamétique avec élimination de spermatozoïdes peu féconds via une RA précoce n'est sans doute pas la bonne. Ainsi, si l'on reprend les travaux de 2011 qui démontrent que les spermatozoïdes ayant subi leur RA précocement avant l'arrivée à la zone pellucide vont participer à la fécondation. En se basant sur leur hypothèse, la question posée était : est-ce que les spermatozoïdes traités avec mGX et réagis vont féconder l'ovocyte ou ceux qui résistent et restent intacts ?

### **Conclusion :**

L'efficacité de la phospholipase A2 murine de groupe X n'est pas dépendante du taux de RA mais d'une action hautement spécifique qui n'est pas mimée par une autre sPLA2 (murine ou humaine) ou par l'action de la progestérone.

***Article 1:***

**The effect of group X secreted phospholipase A2 on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A2 or progesterone**



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)



Research paper

# The effect of group X secreted phospholipase A2 on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A2 or progesterone



Roland Abi Nahed<sup>a,b,1</sup>, Jessica Escoffier<sup>a,b,1</sup>, Charlaïne Revel<sup>c,d</sup>, Louise Jeammet<sup>c,d</sup>, Christine Payré<sup>c,d</sup>, Pierre F. Ray<sup>a,b,e</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>a,b,f</sup>, Gerard Lambeau<sup>c,d</sup>, Christophe Arnoult<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Joseph Fourier, Grenoble F-38000, France

<sup>b</sup> Laboratoire AGIM, Equipe AGC, CNRS FRE3405, La Tronche F-38700, France

<sup>c</sup> Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS – UMR 7275, Valbonne, France

<sup>d</sup> Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France

<sup>e</sup> CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble F-38000, France

<sup>f</sup> CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, BP217, Grenoble cedex 9 F-38043, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 7 November 2013

Accepted 15 November 2013

Available online 25 November 2013

### Keywords:

Sperm  
Secreted phospholipase A2  
Pla2g10  
Progesterone  
In vitro fertilization  
Acrosome reaction

## ABSTRACT

Mouse group X sPLA<sub>2</sub> (mGX) is an acrosomal protein playing an important role in fertilization and controlling acrosome reaction (AR) occurring during capacitation. We demonstrated previously that sperm from mGX knock-out mice had a severely impaired fertilization potential *in vitro*. We also showed that treatment of wild-type sperm with recombinant mGX during capacitation improved fertilization outcome. This interesting property suggests that sPLA<sub>2</sub>s could be used to improve fertilization in assisted reproductive technologies (ART). However the molecular mechanism explaining the mGX-dependent enhancing effect on fertilization outcome remains unclear so far. Interestingly, like progesterone (P4), mGX is a very potent activator of AR and the role of mGX-induced AR in fertilization outcome was not evaluated so far. To assess the role of sPLA<sub>2</sub>-induced AR in IVF, we first tested the potency of 9 mouse and 2 human sPLA<sub>2</sub>s and P4 to trigger AR of mouse sperm. We then tested the ability of 6 of these molecules (mouse Group IIA, mouse Group IID, mouse Group X, human Group V, human Group X and P4) to improve the yield of 2-cell embryos obtained by IVF in mouse. We showed that in the mouse neither P4 nor any of the other sPLA<sub>2</sub>s tested were able to mimic the IVF improvement produced by mGX-treatment. These results demonstrate that sPLA<sub>2</sub>s are not commutable in the context of mouse sperm fertility, indicating that their utilisation in other species, is subjected to the identification of probably unique species-specific active sPLA<sub>2</sub>.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

The sperm plasma membrane is a very specialized structure and its lipid composition is highly regulated during the different steps of sperm maturation, from the sperm passage through the epididymis to its arrival into the oviduct, where fertilization occurs.

The lipid composition of sperm cells is indeed modified several times after the complex differentiation process in the testis. During epididymal transit, acyl groups of the plasma membrane phospholipids are remodelled and oleic, linoleic or arachidonic fatty acids are replaced by docosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids, leading to an enrichment of the sperm plasma membrane in omega3 fatty acids. This remodelling is crucial for sperm function and involves the group III secreted phospholipase A2 (sPLA<sub>2</sub>). Sperm cells from Group III sPLA<sub>2</sub>-deficient mice show a strong motility defect, flagella and acrosome defects, leading to a marked infertility [1]. Accordingly, in human, infertility was also associated with defects in sperm fatty acid composition. Asthenozoospermia is

\* Corresponding author. AGIM, Equipe "Andrologie, Génétique et Cancer", Faculté de Médecine, 38700 La Tronche, France. Tel.: +33 (0)4 76 63 74 08.

E-mail address: [christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr) (C. Arnoult).

<sup>1</sup> The authors consider that the first two authors should be regarded as joint First Authors.

associated with an increase in saturated fatty acid concentration and an imbalance in omega6/omega3 fatty acid composition [2,3]. Moreover, diet, associated with an increased omega3 intake, induced an improved male fertility [4].

Although sperm cells are deeply remodelled during epididymal transit, sperm stocked in the cauda epididymides are still immature. During ejection, their contact with the seminal fluid elicits a first physiological wakeup, as witnessed by their new motility [5]. Sperm is then able to cross the cervical mucus and swim up across the uterus where strong interactions with epithelial cells occur [6]. During the female tract crossing, sperm cells perform a final and necessary maturation step involving lipid and protein remodelling known as capacitation [7]. As for lipid remodelling, the efflux of cholesterol from the plasma membrane is well characterized and considered as one of the first event of capacitation, thereby increasing the plasma membrane fluidity [8]. The membrane fluidity change in turn activates several signalling pathways that transform immature sperm cells into competent cells ready for fertilization [9]. Accordingly, human sperm with a defect in cholesterol composition show an impaired fecundity and lead to infertility [10,11]. Several other processes contribute to the increase of the plasma membrane fluidity as including changes of lipid packing and changes in phospholipids, sphingomyelins and ceramides composition [12]. More particularly, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine located in non capacitated sperm in the inner leaflet of the plasma membrane are translocated to the outer leaflet during capacitation [13,14].

If obviously several families of lipolytic enzymes are concerned in the different stages of lipid remodelling [15], phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) play likely important roles, because of their abundant expression in (i) male reproductive organs [16–19], (ii) in ejaculated sperm [20,21] and (iii) in the female tract [22].

PLA<sub>2</sub>s catalyse the hydrolysis of phospholipids at the sn-2 position and generate lysophospholipids and free fatty acids, which are precursors of different lipid mediators. The PLA<sub>2</sub> superfamily comprises intracellular and secreted PLA<sub>2</sub>s [23]. Intracellular enzymes include Ca<sup>2+</sup>-dependent cytosolic PLA<sub>2</sub>s (group IV PLA<sub>2</sub>s or cPLA<sub>2</sub>s), Ca<sup>2+</sup>-independent PLA<sub>2</sub>s (group VI PLA<sub>2</sub>s or iPLA<sub>2</sub>s) and PAF-acetylhydrolases (group VIII PLA<sub>2</sub>s). The family of secreted PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>s) comprises up to ten catalytically active members classified as group IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X and XIIA. Both intracellular and secreted PLA<sub>2</sub> have been identified in sperm cells [18,20,21]. In mature mouse sperm, the group X sPLA<sub>2</sub> (mGX) is located in the acrosome and is released during acrosome reaction (AR) [20] and participates in the phospholipid remodelling observed during capacitation [14]. Interestingly, sperm from mGX-deficient animals are unable to fertilize oocyte in *in vitro* fertilization (IVF) experiments, demonstrating the crucial function of released mGX in the fertilization stage. Moreover, the addition of recombinant mGX to wild-type sperm during capacitation improves IVF outcome at 24 h, scored as the number of oocytes reaching the two-cell stage. This interesting property enables us to consider the use of sPLA<sub>2</sub> as a potential additive to improve the yield of fertilization in assisted reproductive technology (ART) [24]. To optimize the use of sPLA<sub>2</sub> in ART, the understanding of the molecular pathway(s) activated by sPLA<sub>2</sub> is crucial. The molecular mechanism, underlying the mGX-dependent effect on fertilization outcome, remains however unclear so far. Interestingly, mGX is a very potent activator of AR [20] but the precise role of mGX-induced AR in the improvement of fertilization outcome was not evaluated so far. To determine the role of sPLA<sub>2</sub>-induced AR in IVF, we treated sperm with a set of mouse and human sPLA<sub>2</sub>s as well as progesterone (P4) and compared their capacity to trigger AR and their effect on the yield of two-cell embryos obtained by IVF in order to evaluate a relationship between AR and IVF outcome improvement.

## 2. Material and methods

### 2.1. Biological preparation

All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the local Ethical Review Committee "Agreement N° 296-Grenoble-Institut des Neurosciences -Ethical committee". All animals (OF1) were from Charles River laboratories. All animals used were 6–8 weeks old for females and 2–6 months old for males.

### 2.2. Capacitation

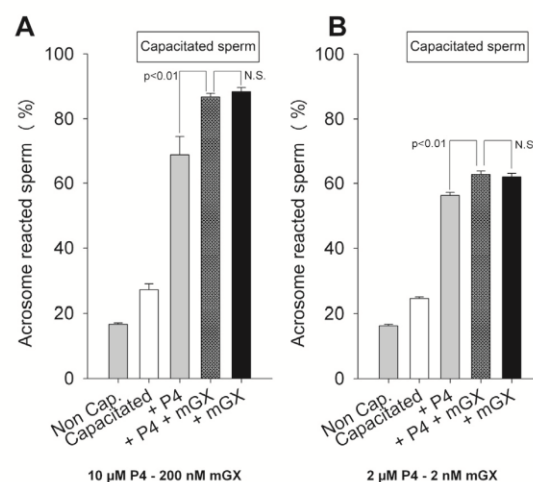
Mouse sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymides from male mice were allowed to swim in M2 medium for 10 min. When specified, sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid-free BSA at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for different times as specified.

### 2.3. AR assay

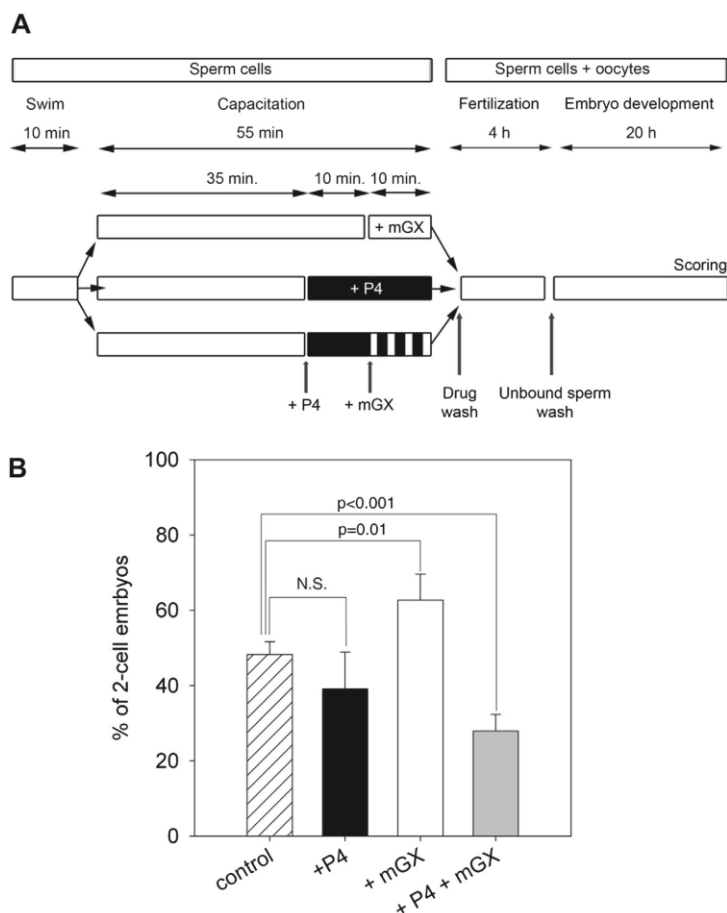
After capacitation, mouse cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% paraformaldehyde solution for 2 min. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 min), wet mounted on slides, and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 min and finally rinsed. Slides were analyzed and at least 150 sperm cells were scored per condition.

### 2.4. *In vitro* fertilization (IVF)

Eggs were collected from mature OF1 females, synchronized with 5 units of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and 5 units of human chorionic gonadotrophin (hCG). Sperm were capacitated for 35–55 min in M16 2% BSA (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) as specified. For treatment with recombinant sPLA<sub>2</sub> or progesterone, sperm were incubated during capacitation for the last 10 min with 200 nM sPLA<sub>2</sub> and/or the last 20 min with 10 μM progesterone. After



**Fig. 1.** Progesterone and sPLA<sub>2</sub> trigger acrosome reaction on the same sperm sub-population. (A) Mouse sperm were first capacitated during 55 min and treated either with 200 nM mGX during 10 min or with 10 μM P4 during 30 min or consecutively with 200 nM during 10 min and 10 μM P4 during 20 min ( $n = 11$ ). Acrosome reacted sperm were then scored. (B) Similar experiments were performed with 2 μM P4 and 2 nM mGX ( $n = 5$ ).



**Fig. 2.** Effects of sperm treatment by progesterone, mouse sPLA<sub>2</sub> of group X or both compounds on fertilization outcome obtained by IVF. (A) Schematic drawing of IVF experiments. Sperm were capacitated for a total duration of 55 min in M16-2% BSA and incubated at the end of the capacitation period with the different effectors as specified i.e., mGX recombinant protein for 10 min, P4 for 20 min or simultaneously P4 and mGX. After treatment, sperm were washed by centrifugation to remove unbound effectors, putative mGX catalytic products and all acrosomal compounds released during sPLA<sub>2</sub>-induced AR. Finally, washed sperm were introduced into droplets containing oocytes (20–109 oocytes per experiment). After 4 h of gamete mixing, unbound sperm were washed away and IVF outcomes were scored at 24 h. (B) Comparison of IVF outcomes obtained with sperm treated in different conditions as explained in A ( $n = 10$ ).

treatment, sperm were washed by centrifugation (500 g, 5 min) to remove unbound enzymes, possible lipid metabolites, and all acrosomal compounds released during induced AR. Finally, washed sperm were introduced into droplets containing oocytes. Oocytes were incubated with  $1.5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$  capacitated sperm/ml (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in M16 medium and unbound sperm were washed away after 4 h incubation. Twenty-four hours after fertilization, the different stages, i.e., unfertilized oocytes, aborted embryos (corresponding to fragmented oocytes or oocytes blocked after the extrusion of the second polar body) and 2-cell embryos (as an indication of successful fertilization) were scored.

## 2.5. Production of recombinant sPLA<sub>2</sub>s

Pure recombinant human and mouse sPLA<sub>2</sub>s were produced in *Escherichia coli* by *in vitro* refolding of inclusion body protein and extensive HPLC purification [25,26]. All purified sPLA<sub>2</sub>s were characterized by gel analysis and mass spectrometry and specific enzymatic activity measured using radiolabeled *E. coli* membranes as substrate [25].

## 2.6. Chemical compounds

M2 medium, M16 medium, progesterone and BSA were purchased from Sigma–Aldrich. PMSG and HCG were from Intervet.

## 2.7. Statistics

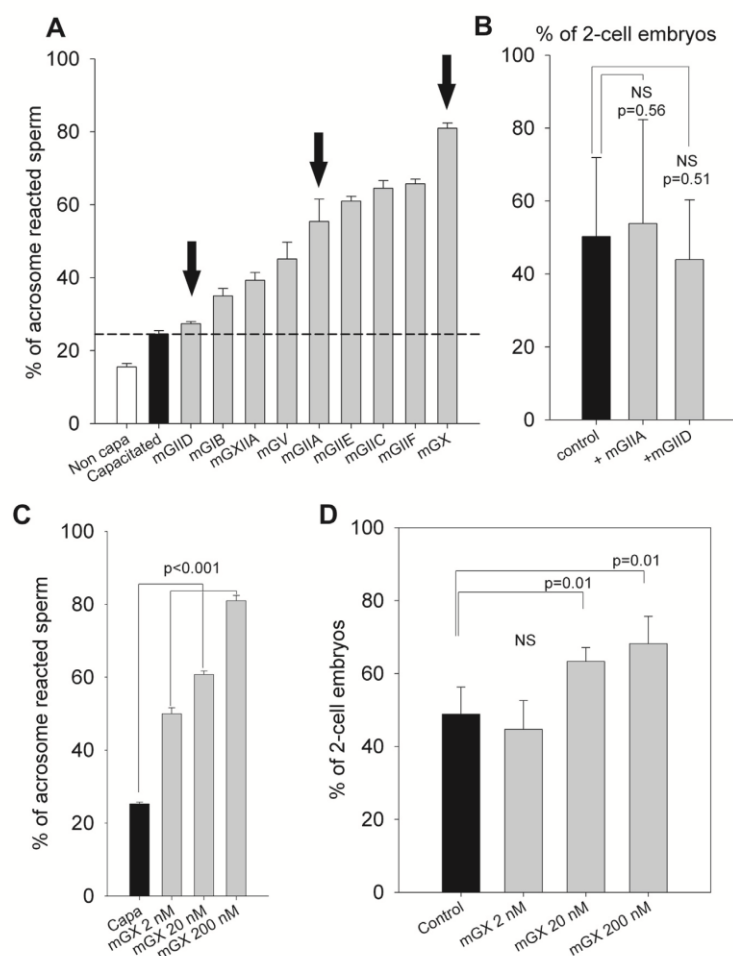
Statistical analyses were performed with SigmaPlot. *T*-test and paired *t*-test were used to compare the effect of the various compounds on AR and fertility, respectively. Data represent mean  $\pm$  SEM. Statistical tests with a 2-tailed *P* values  $\leq 0.05$  were considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. Progesterone and sPLA<sub>2</sub> trigger AR on the same sperm subpopulations

Progesterone (P4) is a natural and strong agonist of AR, and represents an interesting tool to challenge the role of AR in sPLA<sub>2</sub>-





**Fig. 3.** Comparison of the triggering potency of 9 different mouse sPLA<sub>2</sub> on sperm acrosome reaction and the boosting effect on IVF outcome of mGIIA, mGIID and mGX. (A) Capacitated sperm were treated during 10 min with 200 nM of mGIID ( $n = 5$ ), mGIB ( $n = 4$ ), mGXIIA ( $n = 4$ ), mGV ( $n = 7$ ), mGIIA ( $n = 4$ ), mGIIIE ( $n = 5$ ), mGIIIC ( $n = 4$ ), mGIIIF ( $n = 4$ ) and mGX ( $n = 10$ ) and acrosome reacted sperm were scored. Dashed line corresponds to the level of spontaneous acrosome reacted sperm after capacitation and black arrows to the sPLA<sub>2</sub> challenged in this work in Fig. 3B and D as pro-fertility compounds. (B) Sperm were treated with 200 nM mGIIA ( $n = 8$ ) or 200 nM mGIID ( $n = 8$ ) during the last 10 min of the capacitation period and inseminated with oocytes. Two-cell embryos were scored 24 h after insemination. (C) Capacitated sperm were treated 10 min with 2, 20 and 200 nM mGX and acrosome reacted sperm were scored ( $n = 4$ ). (D) Yields of 2-cell embryos obtained with sperm treated with 2, 20 and 200 nM mGX ( $n = 4$ ).

induced boosting effect on IVF outcome. We first compared the potency of P4 and mGX sPLA<sub>2</sub> to induce AR of mouse capacitated sperm. P4 at 10  $\mu$ M was less potent than 200 nM sPLA<sub>2</sub> at inducing AR (Fig. 1A). To test the possible additive or synergistic effect of the two compounds, sperm were simultaneously treated with P4 and mGX and AR scored. Interestingly, the effects of 10  $\mu$ M P4 and 200 nM mGX were neither additive nor synergistic, suggesting that both compounds target the same sperm subpopulation. Because 200 nM mGX triggered by itself a high level of AR, close to 80%, the additive effect of P4-mGX treatment might be not measurable. We thus confirmed this result with lower concentrations of compounds (2  $\mu$ M P4 and 2 nM mGX), which left a larger margin for a potential cumulative effect (Fig. 1B). These results showed that P4 and sPLA<sub>2</sub>-sensitive sperm belong to the same subpopulation. This result is very important to determine the importance of AR in the sPLA<sub>2</sub> effect on sperm fertilization. Indeed, since both compounds target the same subpopulation, if the sPLA<sub>2</sub> effect on IVF is simply due to an increased AR, then P4 should at least mimic it partly.

### 3.2. Progesterone does not mimic the mGX boosting effect on IVF

We then compared the effect of sperm treatment with either 200 nM mGX or 10  $\mu$ M P4 on IVF fertilization outcome. mGX was applied during the last 10 min of capacitation and P4 during the last 20 min of capacitation, before adding the sperm to the oocytes droplets. Fertilization outcome was scored 24 h later (Fig. 2A). The number of 2-cell embryos obtained with non treated sperm and treated sperm were compared. As previously described [20], mGX treatment induced a 30.2% increased fertilization rate (Fig. 2B, from  $48.2 \pm 3.3$  to  $62.7 \pm 7.2\%$ ,  $n = 10$ ). On the other hand, P4 did not modify fertilization outcome, showing that P4-induced AR is not sufficient to improve fertilization outcome. Moreover, a simultaneous treatment with P4 and mGX decreased fertilization outcome by 42% (from  $48.2 \pm 3.3$  to  $27.9 \pm 4.4\%$ ,  $n = 7$ ) (Fig. 2B), although the rate of AR was not changed by the application of both compounds (Fig. 1A and B).

### 3.3. The various recombinant mouse sPLA<sub>2</sub>s have different effects on AR

Since P4 did not produce any beneficial effect on fertilization than mGX while both compounds were able to trigger AR, it suggests that it is the specific enzymatic activity of the sPLA<sub>2</sub> that could be important for the improvement of fertilization outcome rather than its ability to induce AR. The different mouse and human sPLA<sub>2</sub>s are characterized by strong differences in their enzymatic activity against different phospholipids [25]. We first wondered if all sPLA<sub>2</sub> could induce sperm AR and second if other sPLA<sub>2</sub>s were able to boost IVF outcome as mGX sPLA<sub>2</sub> does. The ability of the different mouse sPLA<sub>2</sub>s to induce mouse sperm AR has not been characterized so far. The ability of 9 recombinant mouse sPLA<sub>2</sub>s of groups IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, V, X and XIIA to induce mouse sperm AR at a concentration of 200 nM was thus tested. Their rank order at inducing AR is as follows: mGIID < mGIIB < mGXIIA < mGV < mGIIA < mGIIE < mGIIC < mGIIF < mGX sPLA<sub>2</sub> (Fig. 3A). Interestingly, mGX sPLA<sub>2</sub> is the enzyme that exhibited the strongest effect on AR.

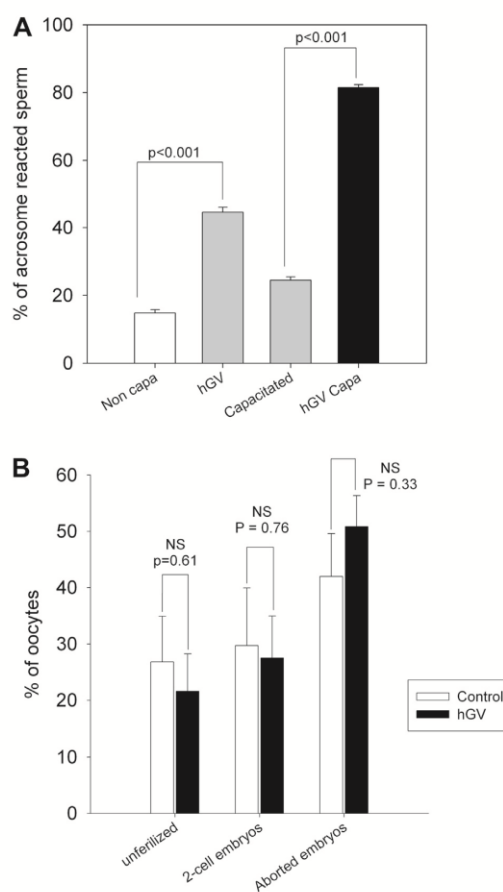
### 3.4. mGIIA and mGIID did not boost fertilization outcome

We then focused more particularly on two different sPLA<sub>2</sub>s, mGIIA and mGIID, which have different potencies on AR but lower than that of mGX sPLA<sub>2</sub> (black arrows, Fig. 3A). We chose mGIIA because this sPLA<sub>2</sub> isoform is present in the seminal plasma [27]. We also chose mGIID because its human ortholog hGIID has been shown to be located in human sperm and activated during progesterone-activated AR [21]. Capacitated sperm were treated with 200 nM of mGIIA or mGIID during 10 min before sperm mixing with oocytes and fertilization outcome was scored and compared 24 h after. Treating sperm with mGIIA and mGIID did not change 2-cell embryos outcome (Fig. 3B). The absence of effect of both mGIIA and mGIID confirms P4 results presented above and strongly suggesting that AR is not the primary cause of fertilization outcome improvement. Moreover, this result suggests that mGX has a specific and unique activity to improve sperm fertilization potential. To confirm the absence of clear relationship between the rate of AR and the increased number of viable 2-cell embryos obtained after mGX sperm treatment, we performed a dose–response experiment with mGX concentrations ranging from 2 to 200 nM. We observed no correlation between mGX-induced AR and the improvement of IVF outcome (Fig. 3C and D). At 2 nM, mGX clearly increased AR from  $25 \pm 0.5$  to  $50 \pm 1.63\%$  without any significant effect on the rate of 2-cell embryos. Together, these results are consistent with what was observed with P4, showing that the rate of AR is not a good index of the ability of a particular sPLA<sub>2</sub> to improve sperm fertilization potential.

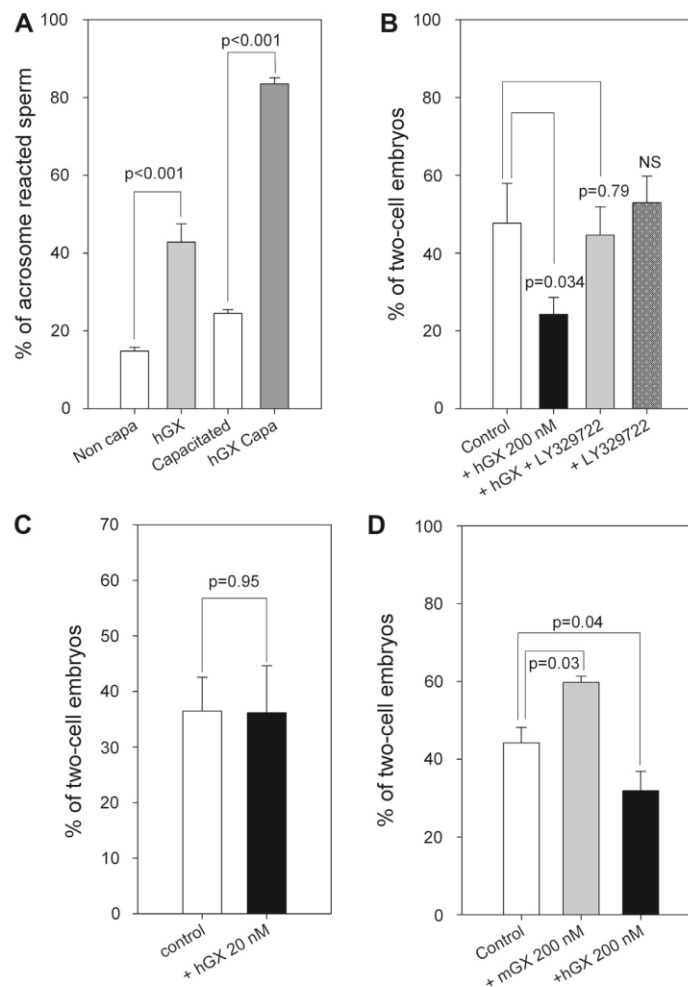
### 3.5. Human GV and GX sPLA<sub>2</sub>s trigger AR of mouse sperm but do not improve IVF

The fact that mGIIA and mGIID were unable to improve IVF, while mGX did, might be due to large differences in their enzymatic specificity. We therefore analysed the literature to compare the specificity of the enzymatic activities of mouse and human sPLA<sub>2</sub> on synthetic phospholipid vesicles: we noticed that human Group V (hGV) and that human Group X (hGX) sPLA<sub>2</sub>, have the closest activity to mGX [25]. The ability of these two human sPLA<sub>2</sub> to boost IVF fertilization outcome was thus tested. We first tested the ability of hGV sPLA<sub>2</sub> to induce AR on capacitated and non capacitated sperm. hGV sPLA<sub>2</sub> triggered AR on capacitated mouse sperm with a potency similar to that observed for mGX, inducing ~80% of AR after a 10 min incubation (Fig. 4A). On the other hand, treating sperm with hGV did not improve the rate of

2-cell embryos (Fig. 4B). Similar experiments were performed with hGX. hGX was a strong activator of AR as well (Fig. 5A), but conversely led to a decrease in the rate of 2-cell embryos (Fig. 5B). Although hGX and mGX sPLA<sub>2</sub>s are mammalian orthologs and thus should have similar enzymatic activity on mouse sperm, we thought that the detrimental effect of hGX sPLA<sub>2</sub> was due to excessive phospholipid hydrolysis, as was observed for the snake venom sPLA<sub>2</sub> OS2 [28]. To test this hypothesis, hGX sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity was inhibited with LY329722, a specific inhibitor of sPLA<sub>2</sub>. The inhibitor blocked the deleterious effect of hGX on 2-cell embryos outcome, but did not increase the IVF rate (Fig. 5B). We obtained similar results when the concentration of hGX was reduced by 10-fold (Fig. 5C). Finally, we confirmed the specific deleterious effect of hGX versus mGX sPLA<sub>2</sub> by simultaneously comparing the effects of the two orthologous sPLA<sub>2</sub>s on the same sperm batch. While mGX improved the formation of 2-cell embryos, hGX decreased this latter (Fig. 5D). The decrease in 2-cell embryos obtained with hGX was thus due to sperm treatment with this peculiar sPLA<sub>2</sub>.



**Fig. 4.** Human sPLA<sub>2</sub> of group V is a potent activator of mouse AR but is unable to improve 2-cell embryos outcome (A) Non capacitated and capacitated mouse sperm were treated during 10 min with 200 nM human sPLA<sub>2</sub> of groups V ( $n = 4$ ) and AR was scored. (B) Effects of sperm treatment by human sPLA<sub>2</sub> of group V on 2-cell embryos outcome. Sperm were treated with 200 nM mGX ( $n = 8$ ) during the last 10 min of the capacitation period and inseminated with oocytes. Embryos were scored 24 h after insemination.



**Fig. 5.** Effects of sperm treatment by human group X (hGX) sPLA<sub>2</sub> on fertilization outcome obtained by IVF. (A) Non capacitated and capacitated mouse sperm were treated during 10 min with 200 nM human sPLA<sub>2</sub> of groups X ( $n = 4$ ) and AR was scored. (B) Sperm were treated with 200 nM hGX ( $n = 8$ ) during the last 10 min of the capacitation period and inseminated with oocytes. Embryos were scored 24 h after insemination. sPLA<sub>2</sub> activity was inhibited by pretreating hGX with 10  $\mu$ M LY329722, a specific inhibitor of sPLA<sub>2</sub> during 10 min prior sperm treatment (grey bars). (C) Similar experiments performed with a concentration of 20 nM mGX. (D) Similar IVF experiments performed simultaneously with mGX and hGX on the same sperm batches ( $n = 4$ ).

All together, our results show no relationship between the rate of AR and the increased number of viable 2-cell embryos when sperm are treated with different sPLA<sub>2</sub>s or P4.

#### 4. Discussion

##### 4.1. mGX sPLA<sub>2</sub> has a unique property of improving fertilization outcome among other sPLA<sub>2</sub>s and P4, and this property is unrelated to its capacity at inducing AR

In this report, we first confirmed our previous results showing that treating sperm with mGX sPLA<sub>2</sub> during capacitation boosted fertilization outcome [20]. We then tested different mouse and human sPLA<sub>2</sub>s and progesterone (P4) and showed that none of these compounds were able to mimic the ability of mGX and to improve fertilization outcome. This paper shows

that mGX sPLA<sub>2</sub> has thus a unique capacity at improving IVF among other mouse sPLA<sub>2</sub> paralogs and even human sPLA<sub>2</sub> ortholog and paralogs. We also previously found that the snake venom sPLA<sub>2</sub> OS2 cannot mimic mGX [28], but this was supposed to be associated with the strong enzymatic activity of OS2 which is 10 times higher than that of mGX [25,29]. Herein, we tested several mammalian sPLA<sub>2</sub>s, including human sPLA<sub>2</sub>s presenting with a very similar enzymatic activity and found that none of the tested sPLA<sub>2</sub>s could improve the yield of 2-cell embryos. Moreover, we showed that no correlation was observed between the level of AR induced by sperm treatment and the rate of 2-cell embryos.

Together, these results indicate that the highly specific effect of mGX on IVF cannot simply be explained by its capacity to trigger AR. Further studies are ongoing to identify the molecular mechanism underlying this peculiar effect of mGX sPLA<sub>2</sub>.

The canonical theory states that the AR occurs when a spermatozoa binds to the zona pellucida (ZP) and it is the proteases released during AR that allow its penetration through the ZP [30]. In other words, if AR occurs before ZP binding, the sperm cell will be unable to cross the ZP and to achieve fertilization. This classical point of view initially led us to propose that the endogenous mGX sPLA<sub>2</sub>, once released by sperm cells, may trigger AR on a particular subpopulation of likely damaged sperm cells, thereby contributing to discard a sub-optimal population and thus to improve fertilisation outcome [20,24]. The above hypothesis that sPLA<sub>2</sub>s improved fertilization outcome by preventing ZP crossing of premature acrosome-reacted sperm is clearly not supported by our current results.

Furthermore, when sperm were treated with mGX sPLA<sub>2</sub>, most sperm cells were acrosome-reacted and as explained above, in the classical point of view, these sperm cells should be unable to cross the ZP and achieve fertilization. However, several recent reports have shown that acrosome-reacted sperm were still able to cross ZP [31,32]. Thus, mGX-induced acrosome-reacted sperm may still be competent for fertilization. It is then unclear which of the two sperm populations, acrosome-reacted or not, are boosted by mGX for improving IVF.

#### 4.2. P4 and sPLA<sub>2</sub> trigger AR by different molecular pathways

The results presented herein brought also new insights into the characterization of P4-activated PLA<sub>2</sub> during AR and the importance of phospholipids hydrolysis in AR. It has indeed been shown that on capacitated sperm, P4 induces the activation of an uncharacterized PLA<sub>2</sub> enzymatic activity during mouse AR [33]. In humans, P4-induced AR seems to activate the group IID sPLA<sub>2</sub> [21]. In the mouse, the only sPLA<sub>2</sub> present in sperm is the mGX sPLA<sub>2</sub> [20]. Is it possible that the PLA<sub>2</sub> activity measured by Pietrobon et al. during P4-induced AR was due to mGX? We showed herein that sperm treated simultaneously with P4 and sPLA<sub>2</sub> had a decreased fertilization ability. This result suggests that sPLA<sub>2</sub>-induced AR does not correspond to a downstream step of P4-induced AR, but rather that both compounds activate two separate pathways leading to AR and whose simultaneous activations is likely deleterious for sperm function.

Second, numerous molecular pathways and proteins have been described to be important for AR, from calcium channels, Rab3a, PLCδ4, Phosphatidylinositol-3-kinase, phospholipases A<sub>2</sub> and different proteins belonging to the SNARE complex [19,30,34]. Importantly, all these pathways are effective only after capacitation, mainly due to the reorganization of the SNARE complex during capacitation [35,36]. Surprisingly, sPLA<sub>2</sub> triggers AR on both capacitated and non capacitated sperm (herein on mouse sperm but also on human sperm (see Figs. 4A and 5A)), suggesting that either SNARE complex is partly in a mature state in non capacitated sperm in these species or that the production by sPLA<sub>2</sub> of fusogenic lipids, like fatty acids and lysophospholipids, promote a fast maturation of the SNARE complex, likely by changing syntaxin conformation [37].

Finally, the effects of P4 and sPLA<sub>2</sub> were not additive when applied simultaneously on mouse capacitated sperm. This result strongly suggests that both compounds target the same subpopulation, likely sharing a similar lipid composition required for membrane fusion. This result underlines the importance of sperm phospholipid composition for AR.

In conclusion, sPLA<sub>2</sub>s play a major role in lipid mediators release and have been involved in numerous physiological and physiopathological functions [38]. A major challenge in this field is to identify the *in vivo* functions of each member of the sPLA<sub>2</sub> family based on their distinct tissue distribution and biochemical properties. However, in numerous tissues including testis, several sPLA<sub>2</sub>s

are expressed and the question concerning a specific role of each of them remains open. In this manuscript, we have investigated the profertility properties of numerous sPLA<sub>2</sub>s and showed that group X sPLA<sub>2</sub> is unique to improve fertility outcome. This result is remarkable because it demonstrates that sPLA<sub>2</sub>s are not commutable, at least in the context of sperm fertility. This result strongly suggests the specificity of action of each sPLA<sub>2</sub>, even if they present *in vitro* slight enzymatic differences.

#### Acknowledgements

We thank Léa Munch and Mohamad Ali Makieh for technical assistance. We are grateful to Pr. Michael Gelb for the generous gift of LY329722. This work was supported in part by CNRS and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-EMMA-042-Lutinfer) (to CA and GL), the Association pour la Recherche sur le cancer (to GL). RA and CR were supported by a grant from ANR-10-EMMA-042-Lutinfer. Université Joseph Fourier and CNRS have filed patent applications on technologies relating to the use of sPLA<sub>2</sub> in ART.

#### References

- [1] H. Sato, Y. Taketomi, Y. Isogai, Y. Miki, K. Yamamoto, S. Masuda, T. Hosono, S. Arata, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, H. Nakanishi, K. Ikeda, R. Taguchi, S. Hara, I. Kudo, M. Murakami, Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (5) (2010) 1400–1414.
- [2] H. Tavilani, M. Doosti, I. Nourmohammadi, H. Mahjub, A. Vaisiraygani, S. Salimi, S.M. Hosseiniapanah, Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77 (1) (2007) 45–50.
- [3] Y. Aksoy, H. Aksoy, K. Altinkaynak, H.R. Aydin, A. Ozkan, Sperm fatty acid composition in subfertile men, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75 (2) (2006) 75–79.
- [4] M.R. Safarinejad, Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study, *Andrologia* 43 (1) (2011) 38–47.
- [5] R.J. Verma, Sperm quiescence in cauda epididymis: a mini-review, *Asian J. Androl.* 3 (3) (2001) 181–183.
- [6] P.H. Hung, S.S. Suarez, Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct, *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 67 (2010) 257–266.
- [7] C.R. Austin, The capacitation of the mammalian sperm, *Nature* 170 (1952) 326.
- [8] A.J. Travis, G.S. Kopf, The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa, *J. Clin. Invest.* 110 (6) (2002) 731–736.
- [9] A.M. Salicioni, M.D. Platt, E.V. Wertheimer, E. Arcelay, A. Allaire, J. Sosnik, P.E. Visconti, Signalling pathways involved in sperm capacitation, *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65 (2007) 245–259.
- [10] A. Zalata, A. Hassan, A. Christophe, F. Comhaire, T. Mostafa, Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient, *Int. J. Androl.* 33 (3) (2009) 528–535.
- [11] M.G. Buffone, S.V. Verstraeten, J.C. Calamera, G.F. Doncel, High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies, *J. Androl.* 30 (2009) 552–558.
- [12] B.M. Gadella, P.S. Tsai, A. Boerke, I.A. Brewis, Sperm head membrane reorganisation during capacitation, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (5–6) (2008) 473–480.
- [13] B.M. Gadella, R.A. Harrison, Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells, *Biol. Reprod.* 67 (1) (2002) 340–350.
- [14] J. Escoffier, V. Pierre, I. Jemel, L. Munch, Z. Boudhraa, P.F. Ray, M. De Waard, G. Lambeau, C. Arnoult, Group X secreted phospholipase A2 specifically decreases sperm motility in mice, *J. Cell. Physiol.* 226 (10) (2011) 2601–2609.
- [15] K.A. Sutton, M.K. Jungnickel, Y. Wang, K. Cullen, S. Lambert, H.M. Florman, Enkurin is a novel calmodulin and TRPC channel binding protein in sperm, *Dev. Biol.* 274 (2) (2004) 426–435.
- [16] S. Masuda, M. Murakami, S. Matsumoto, N. Eguchi, Y. Urade, G. Lambeau, M.H. Gelb, Y. Ishikawa, T. Ishii, I. Kudo, Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs, *Biochim. Biophys. Acta* 1686 (1–2) (2004) 61–76.
- [17] H. Koizumi, N. Yamaguchi, M. Hattori, T.O. Ishikawa, J. Aoki, M.M. Taketo, K. Inoue, H. Arai, Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis, *J. Biol. Chem.* 278 (14) (2003) 12489–12494.
- [18] S. Bao, D.J. Miller, Z. Ma, M. Wohltmann, G. Eng, S. Ramanadham, K. Moley, J. Turk, Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce



- spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility, *J. Biol. Chem.* 279 (37) (2004) 38194–38200.
- [19] E.R. Roldan, Q.X. Shi, Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis, *Front. Biosci.* 12 (2007) 89–104.
  - [20] J. Escoffier, I. Jemel, A. Tanemoto, Y. Taketomi, C. Payre, C. Coatrieux, H. Sato, K. Yamamoto, S. Masuda, K. Pernet-Gallay, V. Pierre, S. Hara, M. Murakami, M. De Waard, G. Lambeau, C. Arnoult, Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (5) (2010) 1415–1428.
  - [21] K. Li, J.Y. Jin, W.Y. Chen, Q.X. Shi, Y. Ni, E.R. Roldan, Secretory phospholipase A2 group IID is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis of human spermatozoa, *J. Androl.* 33 (5) (2012) 975–983.
  - [22] L.I. Eerola, F. Surrel, T.J. Nevalainen, M.H. Gelb, G. Lambeau, V.J. Laine, Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (7) (2006) 745–756.
  - [23] R.H. Schaloske, E.A. Dennis, The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (11) (2006) 1246–1259.
  - [24] C. Arnoult, J. Escoffier, L. Munch, V. Pierre, S. Hennebicq, G. Lambeau, P. Ray, Do phospholipases, key enzymes in sperm physiology, represent therapeutic challenges? *Med. Sci. (Paris)* 28 (5) (2012) 512–518.
  - [25] A.G. Singer, F. Ghomashchi, C. Le Calvez, J. Bollinger, S. Bezzine, M. Rouault, M. Sadilek, E. Nguyen, M. Lazdunski, G. Lambeau, M.H. Gelb, Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2, *J. Biol. Chem.* 277 (50) (2002) 48535–48549.
  - [26] M. Rouault, C. Le Calvez, E. Boilard, F. Surrel, A. Singer, F. Ghomashchi, S. Bezzine, S. Scarzello, J. Bollinger, M.H. Gelb, G. Lambeau, Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor, *Biochemistry* 46 (6) (2007) 1647–1662.
  - [27] T.J. Nevalainen, K.M. Meri, M. Niemi, Synovial-type (group II) phospholipase A2 human seminal plasma, *Andrologia* 25 (6) (1993) 355–358.
  - [28] J. Escoffier, M. Couvet, H. de Pomyers, P.F. Ray, M. Sève, G. Lambeau, M. De Waard, C. Arnoult, Snake venoms as a source of compounds modulating sperm physiology: secreted phospholipases A2 from *Oxyuranus scutellatus* impact sperm motility, acrosome reaction and in vitro fertilization in mice, *Biochimie* 92 (7) (2010) 826–836.
  - [29] M. Rouault, L.D. Rash, P. Escoubas, E. Boilard, J. Bollinger, B. Lomonte, T. Maurin, C. Guillaume, S. Canaan, C. Derégnaucourt, J. Schrevel, A. Doglio, J.M. Gutierrez, M. Lazdunski, M.H. Gelb, G. Lambeau, Neurotoxicity and other pharmacological activities of the snake venom phospholipase A2 OS2: the N-terminal region is more important than enzymatic activity, *Biochemistry* 45 (18) (2006) 5800–5816.
  - [30] H.M. Florman, M.K. Jungnickel, K.A. Sutton, Regulating the acrosome reaction, *Int. J. Dev. Biol.* 52 (5–6) (2008) 503–510.
  - [31] N. Inoue, Y. Satouh, M. Ikawa, M. Okabe, R. Yanagimachi, Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (50) (2011) 20008–20011.
  - [32] M. Jin, E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S.A. Baba, K. Chiba, N. Hirohashi, Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (12) (2011) 4892–4896.
  - [33] E.O. Pietrobon, M. Soria, L.A. Dominguez, M.L. Mondus, M.W. Fornes, Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins, *Mol. Reprod. Dev.* 70 (1) (2005) 58–63.
  - [34] C.N. Tomes, Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis, *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65 (2007) 275–291.
  - [35] P.S. Tsai, I.A. Brewis, J. van Maaren, B.M. Gadella, Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis, *PLoS One* 7 (3) (2012) e32603.
  - [36] F. Rodriguez, M.N. Zanetti, L.S. Mayorga, C.N. Tomes, Munc18-1 controls SNARE complex assembly during human sperm acrosomal exocytosis, *J. Biol. Chem.* 287 (52) (2012) 43825–43939.
  - [37] F. Darios, E. Connell, B. Davletov, Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis, *J. Physiol.* 585 (Pt 3) (2007) 699–704.
  - [38] M. Murakami, G. Lambeau, Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: an update, *Biochimie* 95 (1) (2013) 43–50.



## *Article 2*

### **Introduction + objectif de l'article 2**

Les résultats de ces travaux préalables soulignent à nouveau l'efficacité de la sPLA2 pour accroître le rendement de la fécondation. Cette molécule pourrait par conséquent avoir un effet thérapeutique notoire. Avant d'aller plus loin dans les investigations sur ce sujet, il nous a paru important de mieux caractériser les mécanismes d'action des PLA2 et notamment de la sPLA2. Les précédents résultats nous ont montré que la progestérone, qui augmente le taux de RA, n'a pas d'action significative sur la FIV. On avait donc une piste pour les investigations concernant la RA et la progestérone. En raison de la présence d'au moins deux PLA2 différentes dans le spermatozoïde de souris et parce qu'un cross-talk entre les différentes PLA2 a été décrit (Shirai et al. 2005), nous avons évalué la possibilité de l'implication de plusieurs PLA2 au cours de la RA induite par la P4. Si plusieurs PLA2 sont impliquées, leur contribution respective et leurs fenêtres d'activation au cours du temps méritent d'être caractérisées. Nous voulions voir de façon précise l'implication ou non des différents types de PLA2 dans la réaction acrosomique. La réaction acrosomique (RA) correspond à l'exocytose de la vésicule géante (acrosome) présente dans la tête du spermatozoïde (décrit dans le chapitre 5) et les mécanismes moléculaires impliqués restent partiellement inconnus. Les phospholipases A2 (PLA2) jouent des rôles importants dans la capacitation, la RA et la fécondation. Nous avons par conséquent testé la présence des PLA2 intracellulaires (iPLA2 ou cPLA2) au cours de la RA induite par la P4, mais aussi au cours de la RA spontanée. Pour cela nous avons utilisé différents inhibiteurs spécifiques et on a utilisé des souris KO de chaque type de PLA2. Les PLA2 jouent un rôle central au cours de la RA : l'action de la sPLA2 (sécritée) est aujourd'hui bien documentée mais celle des PLA2 intracellulaires, du fait de leur localisation, était encore mal connue.

### **Résultats et discussion**

L'induction de la RA par la P4 sur des spermatozoïdes de souris KO pour mGX est significativement moindre que l'induction obtenue par la P4 sur des spermatozoïdes de souris wild type, ceci permet de déduire que l'activation de la sPLA2 de groupe X contribue à la RA. De manière similaire, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'iPLA2 (tels que BEL et FKGG18), bloque partiellement la RA. L'induction d'une RA par la P4 sur des souris iPLA2

KO et des souris wild type montre un résultat du même ordre que les résultats obtenus en dessus, ce qui permet de conclure que les iPLA2 contribuent également à la réaction acrosomique. L'utilisation de d'inhibiteurs de iPLA2 sur les spermatozoïdes de souris KO pour mGX et des souris wild type permet d'obtenir une réponse de réaction acrosomique significativement moindre que lorsque l'on utilise isolément soit des souris iPLA2 KO, soit des souris mGX KO, soit des inhibiteurs spécifiques d'un groupe de PLA2. On peut donc en conclure un effet additif des iPLA2 et des sPLA2 de groupe X dans l'augmentation de la réaction acrosomique. Une étude cinétique de la RA sur 30 min avec l'utilisation d'inhibiteur de sPLA2 ou d'iPLA2 ou des 2, montre que la iPLA2 est activée pendant la capacitation (inhibition de la réaction acrosomique spontanée par l'absence de iPLA2) et participe à l'accélération de la RA induite par P4. Au contraire, la sPLA2 s'active dans un deuxième temps et contrôle la RA. Finalement, l'utilisation de souris cPLA2 KO a montré que les PLA2 cytosoliques n'interviennent pas au cours de la RA puisqu'on n'a pas d'effet sur la réaction acrosomique spontanée ou induite par la P4.

La RA induite par la P4 est fortement bloquée par l'inhibiteur d'iPLA2. Ainsi, pour la RA induite par la P4, différentes PLA2 sont impliquées : les iPLA2 interviennent en début de RA puis celle-ci est amplifiée par l'activation de la sPLA2 du groupe X. Des phénomènes de coopération entre différents types de PLA2 pour amplifier une réponse biologique ont précédemment été décrits dans différents types de cellules.

Par conséquent, l'augmentation de la concentration calcique, au cours de la RA induite par la P4 (voire le chapitre 5, partie 4.1), booste l'activité enzymatique PLA2 et favorise la fusion membranaire par l'intermédiaire de l'ouverture du pore de fusion provoquée par des réarrangements des protéines SNARE induite par la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  à la synaptotagmine. Concernant le mécanisme d'action précis de la P4, la nature du récepteur (Blackmore and Lattanzio, 1991) qui lui permet d'activer la RA demeure inconnue. Récemment, un récepteur spermatique à la P4 a été mis en évidence au niveau de la membrane flagellaire. Ce récepteur est le canal CatSper, dont l'action module la mobilité spermatique en modifiant le battement du flagelle et le chimiotactisme. Cependant, des études d'imagerie calcique ont démontré que, pour l'induction de la RA, la P4 induit un influx de calcium qui commence au niveau de la tête, par le biais de la PLC $\delta$ 4 et de canaux calciques appropriés. Ainsi les canaux Catsper ne semblent pas être les récepteurs responsables de la RA, ces derniers seraient plutôt sur la tête du spermatozoïde, et l'inhibition du canal CatSper par NNC ne modifie pas le taux de la RA.

### **Conclusion :**

La réaction acrosomique est un processus très complexe qui implique plusieurs PLA2. Des phénomènes de coopération (cross-talk) entre la iPLA2 $\beta$  et la sPLA2 (mGX) pour amplifier une réponse biologique ont précédemment été décrits dans différents types de cellules. Et pour la première fois on a pu montrer que les iPLA2 jouent un rôle très important dans la réaction acrosomique.



# **Calcium-independent iPLA<sub>2</sub>β and group X sPLA<sub>2</sub> are successively activated during progesterone-induced acrosome exocytosis**

Roland Abi Nahed<sup>1,2</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2</sup>, Sandra Yassine<sup>1,2</sup>, Thomas Karaouzène<sup>1,2</sup>,  
Guillaume Martinez<sup>1,2</sup>, Pierre Ray<sup>1,2,3</sup>, Serge Bottari<sup>1,4,5</sup>, Gérard Lambeau<sup>6,7</sup>, Sylviane  
Hennebicq<sup>1,2,8</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>

1 Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France

2 Institut Albert Bonniot, INSERM U823, La Tronche, F-38700, France

3 CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

4 Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U1055, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9

5 CHU de Grenoble, Plate-forme de Radioanalyse, IBP, CS10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

6 Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France

7 Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire CNRS UMR 7275, 06560 Valbonne, France

8 CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, CS1021, Grenoble cedex 9, F-38043, France

\*corresponding author

Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Team " Genetic, Epigenetic and Therapies of Infertility"

Insitut Albert Bonniot, INSERM U823

University Grenoble Alpes,

38000 Grenoble, FRANCE

[christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr)

33- 476 637 408

Key words: sperm; acrosome reaction; iPLA<sub>2</sub>β, group X sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>α, Calcium, progesterone

**Under submission Journal of Cell Science JCS**

## Abstract

The importance of phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) activity in sperm acrosome reaction (AR) was demonstrated several decades ago. However, the molecular identity of the involved PLA<sub>2</sub>s and their number were not determined because 1/ the diversity of PLA<sub>2</sub> enzymes was unsuspected and 2/ specific inhibitors were unavailable. Herein, we tested the involvement of two intracellular PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ), and one secreted PLA<sub>2</sub> (group X sPLA<sub>2</sub>) in spontaneous and progesterone (P4)-induced AR by using specific inhibitors and the corresponding knock-out mice. We first showed the importance of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  in spontaneous AR occurring during capacitation. We next demonstrated that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and group X sPLA<sub>2</sub> are both involved in P4-induced AR in mouse sperm. On the other hand, cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  is involved neither in capacitation nor AR periods. P4-induced AR is a long lasting event, spreading over 30 min in mouse and by performing kinetic analyses, we showed the presence of different sperm subpopulations, which do not rely on the same molecular pathways to achieve their AR. At low progesterone concentration, sperm achieving their AR early (0-10 min post-P4) rely only on iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , whereas sperm achieving their AR late (15-30 min post-P4) rely mainly on group X sPLA<sub>2</sub>. We thus showed that AR is not a homogeneous molecular process and changes over time. Moreover, we showed that PLA<sub>2</sub> activation depends upon P4 concentrations, PLA<sub>2</sub>s being key actors at low P4 concentrations close to physiological concentration ( $\leq 2\mu\text{M}$ ) but less important at P4 concentrations above 10  $\mu\text{M}$ , suggesting that future studies focusing on molecular pathways involved in P4-induced AR should take this parameter into account.

## Introduction

Acrosome reaction (AR) is an exocytotic and mandatory event occurring in the cumulus oophorus or on the zona pellucida of the oocyte and allows the release of several types of sperm enzymes including hyaluronidase (Hyal5), proteases, phospholipase and arylsulfatase. The release of these enzymes leads to a partial hydrolysis of several components of the layers surrounding the oocyte, allowing the sperm to reach the oolema where the fusion between both gametes occurs. The exocytosis leads to a change of the structure of the plasma membrane of the sperm as well, unmasking the Izumo protein that is necessary for gametes' fusion (Inoue *et al.*, 2005). The physiological agonists of AR and their respective downstream molecular pathways leading eventually to the fusion of the outer acrosomal membrane with the plasma membrane of the sperm are the object of intense investigation (Florman *et al.*, 2008; Roldan and Shi, 2007). Two main physiological agonists were identified, progesterone (P4), which is released by the cells of the cumulus oophorus and ZP3, one of the glycoproteins of the zona pellucida (Bleil and Wassarman, 1983; Roldan *et al.*, 1994; Thomas and Meizel, 1989). As in most exocytosis processes,  $\text{Ca}^{2+}$  plays a central role, and blocking the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]$  completely inhibits AR. It is accepted that the main targets of  $\text{Ca}^{2+}$  are specific sperm SNARE proteins (Rodriguez *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012), even if  $\text{Ca}^{2+}$  also activates calmodulin-dependent enzymes such as PI3-K whose inactivation blocks the AR (Jungnickel *et al.*, 2007). Numerous actors involved in the  $[\text{Ca}^{2+}]$  increase, dependent on the agonist, have been characterized including  $\text{Ca}^{2+}$  influx through activation of voltage-dependent calcium channels and store-operated channels and calcium release from the acrosome itself through activation of PLC $\delta$ 4 and the IP3 receptor (Cohen *et al.*, 2014; Florman *et al.*, 2008). Contrary to neuronal exocytosis where  $[\text{Ca}^{2+}]$  increase is followed by degranulation within milliseconds, a long lasting calcium signaling is required for sperm granule exocytosis, which lasts for more than 30 minutes in mouse. Several molecular pathways are activated during the first minutes which are mandatory for sperm AR, including phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>). These enzymes catalyze the hydrolysis of phospholipids at the sn-2 position and generate lysophospholipids and free fatty acids which are precursors of different lipid mediators. Involvement of PLA<sub>2</sub> in acrosome reaction was suggested 30 years ago by experiments showing that a PLA<sub>2</sub> activity was associated with mouse acrosomal membranes and was inhibited by non specific PLA<sub>2</sub> inhibitors such as indomethacin, sodium

meclofenamate, mepacrine and p-bromophenacyl bromide (Thakkar *et al.*, 1983). The role of PLA<sub>2</sub> was reinforced by indirect results showing that fatty acids and lysophospholipids could trigger acrosome reaction (Fleming and Yanagimachi, 1984; Llanos *et al.*, 1993; Meizel and Turner, 1983). By using C14-labeled fatty acids, Roldan and colleagues showed that fatty acids are released during AR of ram sperm and that RO314493, a PLA<sub>2</sub> inhibitor, blocked both fatty acid release and acrosome reaction (Roldan and Fragio, 1993). Similar results were found in guinea pig sperm, where progesterone or ZP-induced fatty acids release and AR were blocked by aristolochic acid, another PLA<sub>2</sub> inhibitor (Shi *et al.*, 2005). Another study showed that mouse AR is also blocked by ONO RS-82, a different PLA<sub>2</sub> inhibitor (Pietrobon *et al.*, 2005). Taken together, these studies showed that activation of PLA<sub>2</sub> plays a central role in AR and that production of fatty acids and/or lysophospholipids is required for acrosomal and plasma membrane fusion during AR.

At this time, the molecular characterization of the PLA<sub>2</sub>(s) involved in AR observed in these pharmacological studies was however impossible because of the lack of data regarding the specificity of the above used PLA<sub>2</sub> inhibitors. Indeed, the PLA<sub>2</sub> superfamily comprises 37 different enzymes, divided in 16 groups and many more subgroups. It includes 5 distinct types of enzymes, namely the cytosolic PLA<sub>2</sub>s (cPLA<sub>2</sub>), the Ca<sup>2+</sup> independent PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub>), both groups being intracellular, the secreted PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>), which comprises up to ten catalytically active members classified as group IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X and XIIA and more specific groups like the platelet-activating factor acetylhydrolases (PAF-AH), the lysosomal PLA<sub>2</sub>s and the adipose PLA<sub>2</sub> (Dennis *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2011). Both intracellular and secreted PLA<sub>2</sub> have been identified in mouse and human sperm cells (Bao *et al.*, 2004; Escoffier *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). In mature mouse sperm, the group X sPLA<sub>2</sub> (mGX) is located in the acrosome and is released during AR (Escoffier *et al.*, 2010). It specifically improves fertilization and early embryo development (Abi Nahed *et al.*, 2014; Escoffier *et al.*, 2010; Escoffier *et al.*, 2011).

One of the challenging questions about PLA<sub>2</sub>s is their respective contribution in cellular functions for which specific drugs are needed. PLA<sub>2</sub>s are involved in numerous physiopathological processes like inflammation or heart diseases (Hui, 2012; Murakami and Lambeau, 2013) and the pharmaceutical industry has made important efforts to discover specific compounds with the highest possible affinity (Dennis *et al.*, 2011). Among the different emerging drugs, the following drugs with reported specificities represent valuable tools to decipher the role of PLA<sub>2</sub> in AR. For sPLA<sub>2</sub>, LY329722 (LY) is an interesting

compound, which was developed by Eli Lilly Pharmaceuticals from a lead compound, LY 311727, a very potent inhibitor of human group IIA sPLA<sub>2</sub> (hGIIA) (Schevitz *et al.*, 1995). LY329722 inhibits several subgroups of sPLA<sub>2</sub> (I/II/V/X) and has an IC<sub>50</sub> of 30 nM for the group X sPLA<sub>2</sub>. For iPLA<sub>2</sub>, two inhibitors emerged: S-BromoEnol Lactone (BEL) and FKGK18. BEL is a selective and irreversible inhibitor of iPLA<sub>2</sub>β with a half-maximal inhibition around 60 nM after preincubation (Ackermann *et al.*, 1995). Although it is a potent inhibitor of iPLA<sub>2</sub>β, BEL also inhibits non-PLA<sub>2</sub> enzymes (Ali *et al.*, 2013). For this reason FKGK18, a recently characterized new iPLA<sub>2</sub>β inhibitor, presenting less off-target effects with a similar potency (Ali *et al.*, 2013) was identified. It is known as the most potent iPLA<sub>2</sub>β inhibitor yet reported, being ~200 and ~400 times more potent for iPLA<sub>2</sub>β than for cPLA<sub>2</sub>α and sPLA<sub>2</sub>, respectively (Dennis *et al.*, 2011). FKGK18 is thus a valuable tool to study the roles of iPLA<sub>2</sub>β during AR. Finally, Pyrrolidine-1 (Pyr-1), a pyrrolidine-based inhibitor, was identified to inhibit cPLA<sub>2</sub>α (IC<sub>50</sub> = 70 nM). *In vitro* assays showed that it is less potent on cPLA<sub>2</sub>γ and iPLA<sub>2</sub>β (IC<sub>50</sub> ~10 μM) and that 10 μM has no inhibitory effect on groups IIA, X, and V secreted PLA<sub>2</sub>s (Ghomashchi *et al.*, 2001).

Because of the presence of a least two different PLA<sub>2</sub>s in sperm and because a cross-talk between different PLA<sub>2</sub>s has been described (Shirai *et al.*, 2005), we assessed the possibility of the involvement of several PLA<sub>2</sub>s during mouse P4-induced AR. If several PLA<sub>2</sub>s are involved, then their respective contribution and their time windows of activation deserve to be characterized. Herein, we show for the first time, using characterized pharmacological tools and knock-out mice, that two PLA<sub>2</sub>s are activated subsequently during mouse AR: iPLA<sub>2</sub>β and mouse group X sPLA<sub>2</sub> (mGX). Capacitation activates iPLA<sub>2</sub>β and primes spontaneous AR. Interestingly we showed that the overall contribution of PLA<sub>2</sub> in AR depends upon P4 concentration. At low P4 concentrations (≤2 μM), iPLA<sub>2</sub>β is necessary to obtain a fast triggering of P4-induced AR and mGX activation is mandatory to sustain AR after the initial phase. At high P4 concentrations (10 μM), robust [Ca<sup>2+</sup>] increase is sufficient to obtain a fast triggering. Nevertheless AR is boosted by both PLA<sub>2</sub>s since iPLA<sub>2</sub>β inhibition leads to a lower overall level of AR at 30 min and mGX inhibition to a drop of P4-induced AR rate after 10-15 min.

## Results

### iPLA<sub>2</sub>β controls spontaneous AR during capacitation

Sperm should undergo a maturation step, known as capacitation, before achieving their AR, which is induced by components of the surrounding layers of the oocyte. However, during capacitation, a subpopulation of sperm undergoes AR without any external stimuli, a process known as spontaneous AR (SAR). We previously showed that the early phase of SAR (< 45 min of capacitation) is independent of mGX, contrary to the late phase (at 90 min) (Escoffier et al., 2010; Escoffier et al., 2011). Because PLA<sub>2</sub> are key actors of AR, this result raised the question of whether another PLA<sub>2</sub> could be involved during the early phase of SAR. To test this hypothesis, we first measured SAR of sperm from KO males lacking mGX, iPLA<sub>2</sub>β or cPLA<sub>2</sub>α. The rate of AR of control sperm from WT males was compared to KO littermates. Interestingly no SAR was observed in the absence of iPLA<sub>2</sub>β during capacitation, contrary to what observed in the case of sperm from cPLA<sub>2</sub>α and mGX KO males (Fig. 1B). This result suggested that activation of iPLA<sub>2</sub>β is important in the early phase of SAR. To confirm this result, sperm were incubated in capacitation medium with the following PLA<sub>2</sub> inhibitors: BEL and FKGK18 for iPLA<sub>2</sub>β and LY for mGX. Among the 3 different inhibitors, only those targeting iPLA<sub>2</sub>β were able to inhibit SAR (Fig. 1C), confirming that iPLA<sub>2</sub>β is activated during capacitation and is necessary to trigger AR during the capacitation period. The inhibition of SAR of sperm incubated with BEL in the capacitation medium is unlikely to be due to an absence of capacitation since protein phosphorylations on tyrosine residues was unchanged with BEL (Fig. 1D).

Capacitation is a Ca<sup>2+</sup>-dependent event, and Ca<sup>2+</sup> signalling occurring during capacitation may trigger SAR in conjunction with iPLA<sub>2</sub>β metabolites. To better characterize calcium signalling responsible of SAR and because PLCδ4 is an important actor of AR (Fukami *et al.*, 2003), SAR was measured first in the presence of U73122, a PLC inhibitor already shown to be a potent inhibitor of AR (O'Toole *et al.*, 2000). U73122 partially blocked SAR suggesting that Ca<sup>2+</sup> influx may be also an important component of Ca<sup>2+</sup> signalling triggering SAR. Sperm were thus incubated in M2 medium containing different free [Ca<sup>2+</sup>] and rates of SAR were measured: at 100 μM free Ca<sup>2+</sup>, SAR was completely inhibited, showing that Ca<sup>2+</sup> influx

is necessary for SAR (Fig. 2A). The inhibition of SAR of sperm incubated in solution containing 100  $\mu\text{M}$  free  $\text{Ca}^{2+}$  is unlikely due to an absence of capacitation since protein phosphorylations on tyrosine residues was unchanged (supplementary Fig. 1). Interestingly, calcium transients were recorded in non stimulated capacitated mouse sperm by calcium imaging, using sperm loaded with the fluo-4 calcium dye (Fig. 2B). The number of oscillating sperm increased from 10% to 50% when sperm were incubated in medium supporting capacitation, suggesting that these calcium transients were triggered by capacitation (Fig. 2C). Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$  transients were abolished in low external  $[\text{Ca}^{2+}]$ , suggesting that they are dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Fig. 2D). Thus, capacitation triggers  $\text{Ca}^{2+}$  transients and SAR, both events being dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Moreover, SAR was inhibited by BEL, an  $\text{iPLA}_2\beta$  inhibitor.

### **Dose-response curve and kinetic of P4-induced AR and physiological concentration of P4 in cumulus oophorus**

We next focused our study on P4-induced AR. We first performed a dose-response curve of AR as function of P4 concentration ( $[\text{P4}]$ ) in our experimental conditions and P4 was tested between 0.1 and 50  $\mu\text{M}$ . The dose-response curve is a bell shape curve, and 10-15  $\mu\text{M}$  of P4 elicited the highest response with 70% of acrosome reacted sperm after 30 min of incubation (Fig. 3A). Such concentrations are generally used in reports studying molecular pathways involved in AR.

However, it may not represent the physiological concentrations met by the sperm during their journey to the oocyte. In order to better evaluate  $[\text{P4}]$  in the cumulus oophorus,  $[\text{P4}]$  was determined by radioimmunoassay both in the extra and in the intra-cellular compartments. Cumulus mass were obtained from superovulated females, the number of cumulus oophorus counted and layered dry into 1 ml plastic tubes. Superovulation was confirmed by plasma P4 concentrations determined to be around 150 nM ( $154.4 \pm 35.12$  nM,  $n=5$ ). In the cumulus we found the intracellular progesterone concentrations to range from 0.6  $\mu\text{M}$  to 1.8  $\mu\text{M}$  and the extracellular concentration to be comprised between 0.69  $\mu\text{M}$  and 2.3  $\mu\text{M}$ . Since progesterone, being a lipophylic hormone, is released in the extracellular fluid as soon as it is produced, it was expected to find comparable intra- and extracellular concentrations. Because fertilization does not occur immediately after sperm introduction into the cumulus droplet,

cumuli were incubated during 60 and 120 min in the fertilization medium and [P4] was measured in both cumulus oophorus and in the incubation medium (Fig. 3B). Both intra- and extracellular concentrations were determined in freshly collected cumuli as well as after incubation. Extracellular progesterone concentrations tended to decrease with time, i.e. from 2.3 to 1.03  $\mu\text{M}$  whereas they were stable intracellularly. These observations suggest that progesterone synthesis is constant during at least 2 hours under these conditions. The decrease in extracellular progesterone concentration may be due to its reuptake by the cumulus cells and its metabolism into 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, a precursor of androstenedione which is subsequently metabolized to estrone and testosterone, which are both precursors of estradiol. The physiological concentration of P4 met by sperm during cumulus oophorus crossing is thus approximately 10 times less than the concentration usually tested in the literature. For this reason, two concentrations of P4 were tested: 2  $\mu\text{M}$ , a concentration close to the physiological one and 10  $\mu\text{M}$  a concentration tested in different reports and leading to the highest rate of AR.

Because AR spreads over a long period of time, the measure of the final AR rate at 30 min gives only a partial understanding of the mechanisms involved. To obtain a better insight, AR was monitored every 5 minutes after P4 treatment (2  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  P4) during 60 min (Fig. 3C). First, in absence of AR agonist, the SAR was responsible for less than 5% of the P4-induced AR, since the rate of AR increased from 23 to 28% during this period (Fig. 3C, black circles, n=3-6). At 2  $\mu\text{M}$  P4, analysis of the kinetic of AR of sperm suggests the presence of two phases, evidenced by a significant slope change of the curve between 10 and 15 min after P4 introduction in the medium (Fig. 3C, green triangles, n=12). Moreover, after 30 min, the rate of AR reached a plateau, suggesting that a subpopulation of sperm (~45%) is insensitive to 2  $\mu\text{M}$  P4. Interestingly, at 10  $\mu\text{M}$  P4 the kinetic of AR was different (Fig. 3C, red circles, n=12): the initial increase of AR (0-10 min) is stronger (as showed by the comparison of the slope measured at 2  $\mu\text{M}$  P4 versus that measured at 10  $\mu\text{M}$  P4). Moreover, any change in the slope was observed between 0 and 30 min. Finally, the AR reached similarly a plateau after 30 min, but the level of the plateau is higher, the P4-reluctant subpopulation decreasing to 30%.

### **AR is inhibited by different PLA<sub>2</sub> inhibitors**

We first evaluated the involvement of iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , sPLA<sub>2</sub> and cPLA $\alpha$ , by measuring the potency of S-bromoenol lactone (BEL), FKGGK18, LY329722 (LY) and pyrrolidine-1 (Pyr-1) on P4-



induced AR. All these compounds were tested on sperm capacitated during 35 min and further incubated during 30 min with 2 or 10  $\mu$ M P4 and the AR rate was compared to the level obtained in the absence of the tested drug. The 4 compounds are potent inhibitors of P4-induced AR with similar inhibitory effects: at 2  $\mu$ M P4 AR is inhibited by ~25% and at 10  $\mu$ M by ~30% (Fig. 4). These results suggest that iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , sPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  are involved in P4-induced AR in mouse.

### **AR measured in iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , mGX and cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ KO mice**

To confirm this result, AR of sperm from KO males deficient for mGX, iPLA<sub>2</sub> $\beta$  or cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  were analyzed. The rate of AR of control sperm from WT males was first compared to KO littermates. For iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and mGX KO males, the absence of the corresponding protein leads to a decrease of the rate of AR and the percentage of decrease is close to those measured in pharmacological experiments (Fig. 5AB). Unexpectedly, no difference was observed in the case of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO sperm (Fig. 5C), a result clearly in discrepancy with Pyr-1 experiment and which questions about the specificity of Pyr-1. To address the question of the specificity of the selected PLA<sub>2</sub> inhibitors, the inhibitory effects of BEL, LY and Pyr-1 were measured on iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , mGX, and cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO mice respectively. BEL and LY were no longer potent on AR of sperm obtained from iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and mGX KO males respectively (Fig. 5DE), demonstrating that the inhibitory effect measured with these drugs is due to inhibition of their respective expected target. On the other hand, Pyr-1 presented the same inhibitory effect on both cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO and WT sperm (Fig. 5F). This latter result, associated with the fact that the rates of AR of sperm from cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO and WT males were similar, demonstrates that cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  is not involved in mouse sperm AR and that Pyr-1 at 1  $\mu$ M inhibits AR through a protein which is not cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ . Because this protein may be iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , the inhibitory effect of Pyr-1 was measured on iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO mice: Pyr-1 was ineffective to block AR (supplementary Fig. 2), strongly suggesting that the target of Pyr-1 was actually iPLA<sub>2</sub> $\beta$ .

### **iPLA<sub>2</sub> $\beta$ controls the initial phase of AR at low P4 concentration**

We have shown herein that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibition, either through pharmacological tools or genetically modified mice, led to a decrease of the total P4-induced AR rate. Because iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibited also SAR, we wondered if the inhibition of AR rate observed with BEL or FK628 might be due to SAR inhibition during the capacitation period. To address, this question, AR

was monitored every 5 minutes after P4 treatment and two experimental designs were tested, with BEL introduced either at the beginning or at the end of the capacitation period. Two doses of P4 were tested: 2  $\mu$ M and 10  $\mu$ M.

Whenever when the iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibitor BEL was introduced, the response to 2  $\mu$ M P4 was clearly delayed and no increase was observed during the first 5 min (Fig. 6A), demonstrating first that BEL inhibition is independent on the level of SAR and second that the initial increase of AR is dependent on iPLA<sub>2</sub> $\beta$  activation. The rate of increase during the next 5 min was then similar in both conditions. It is worth noting that after 10 min, the slope of AR rate increase of sperm capacitated with BEL was steeper than that of sperm treated with BEL after capacitation, leading eventually to the superimposition of both curves. Moreover, it is important to notice that the slope change observed with control sperm (Fig. 3C, green circles) was abolished with BEL in both experimental approaches, suggesting that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  contributes to AR during the whole period. Altogether, the observed final inhibition of ~30% of AR with BEL is thus due to the delayed response and the absence of slope increase. At 10  $\mu$ M P4 and contrary to what observed for 2  $\mu$ M P4, the initial increase was only partially inhibited when BEL was introduced after capacitation (Fig. 6B, black square versus red circles) and no delay of the response to P4 was present when sperm were treated with BEL from the beginning of the capacitation (Fig. 6B, green triangles), suggesting that at this P4 concentration iPLA<sub>2</sub> $\beta$  contributed slightly to the onset of AR. However the inhibition of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  impacted the overall increase of AR rate, suggesting that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  contributed to AR during the whole period at both P4 concentrations.

Similar results were obtained with the iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO mice (Supplementary Fig. 3). At 2  $\mu$ M P4, the initial rise (0-10 min) was greatly reduced contrary to that measured at 10  $\mu$ M P4. At 10  $\mu$ M P4, a significant difference was observed between WT and KO sperm during the late phase, confirming that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  contributes to AR during the whole period.

#### **AR inhibition by sPLA<sub>2</sub> inhibitors is P4 concentration-dependent.**

LY had no effect on SAR measured during 35 min and this strongly suggested that mGX is involved only in P4-induced AR. To obtain a better insight of mGX role throughout the process of AR, we first compared the rate of AR with or without LY during 30 min after P4 stimulation. Contrary to what observed with BEL, the initial rise of AR was not modulated by LY at both P4 concentrations (Fig. 7AB, green square). In the other hand, LY inhibited the

second phase starting between 10 and 15 min. Interestingly, the rate of AR of mGX KO sperm presented a very similar kinetic, confirming the specific inhibition of mGX by LY (Fig. 7AB, red circles). Importantly, the inhibition was more pronounced at 2  $\mu$ M than 10  $\mu$ M, with 68% and 56% of inhibition respectively (Fig. 7AB), suggesting that different pathways are activated at different P4 concentrations. To address this hypothesis, we measured the inhibition of AR by LY as a function of P4 concentration. For P4 concentrations below 1  $\mu$ M, LY inhibition was very strong and AR was almost completely abolished (Fig. 7C). On the other hand, the potency of LY decreased when P4 concentration increased above 1  $\mu$ M, strongly suggesting that an alternative sPLA<sub>2</sub>-independent AR pathway is activated at high concentrations of P4.

### **sPLA<sub>2</sub> release is necessary for mGX action and mGX acts in an autocrine mode**

While iPLA<sub>2</sub> $\beta$  acts clearly inside the cell to trigger AR, where acts mGX sPLA<sub>2</sub>: inside the acrosome or outside the sperm after its release during AR? Two points argue for its action outside the sperm: i) mGX is a secreted PLA<sub>2</sub>, located in a giant vesicle of secretion, the acrosome (Escoffier *et al.*, 2010) and ii) AR is inhibited by LY, an inhibitor presenting a low membrane permeability because of its polar structure. However LY presents also large hydrophobic residues (Fig. 4) that may allow its translocation into the cell and mGX inhibition directly inside the cell. To address this possibility, we compared the potency of two inhibitors of mGX: LY and a specific functional antibody targeting mGX. It is very unlikely that mGX antibody crosses the plasma membrane and it should be considered as an extracellular inhibitor only. At both P4 concentrations, mGX Ab was as efficient as LY (Fig. 8AB). Altogether, these results demonstrate that mGX triggers AR only after the fusion of the plasma membrane with the outer acrosomal membrane, which allows the entry of membrane impermeable compounds. Nevertheless, the release of mGX into the external medium could be greatly reduced, due to its high affinity for phospholipids and mGX may be caught, at least at the AR onset, by its own membrane. Thus, mGX could act either in an autocrine mode if mGX is caught by its own membrane or in a paracrine mode if mGX is released in the capacitation medium. To assess this question, we measured the rate of AR of sperm capacitated at 10<sup>6</sup> or at 10<sup>4</sup> sperm per ml, assuming that reducing sperm concentration by 100 fold should decrease mGX concentration in the sperm medium of a similar factor and thus should modify the rate of AR (or its kinetic) if mGX acts in a paracrine mode. We have indeed showed that the variation of AR as a function of the concentration of recombinant

mGX sPLA<sub>2</sub> is linear between 0.1 and 200 nM (Escoffier *et al.*, 2010). We thus first determined the mGX concentration using specific and sensitive (down to 5 pg per assay for mGX) time resolved fluoroimmunoassays (TR-FIAs) developed quite recently (Nevalainen *et al.*, 2005). mGX was measured from total epididymal sperm extract and the mGX total weight per male, expressed as mean  $\pm$  STD was  $36.27 \pm 10.7$  ng, (n=12), corresponding to approximately  $\sim 0.2$  nM for  $10^6$  sperm/ml. At  $10^4$  sperm/ml, a sperm concentration 100 times less, the expected total mGX concentration would be thus 0.002 nM if mGX was fully released in the incubation medium. When recombinant sPLA<sub>2</sub> was used at 0.2 nM, mGX acrosome reacted sperm increased from 23 to 32% whereas a concentration 10 times less was ineffective to trigger AR of capacitated sperm (Fig. 8C). Therefore, it was expected to measure a change in the rate/kinetic of AR between both sperm concentration conditions, if mGX acted in a paracrine mode. The kinetic of AR was measured each 5 minutes after P4 treatments and interestingly, neither kinetic nor total rate were modified by a 100 fold decrease of sperm concentration (Fig. 8DE), suggesting that mGX was not released homogenously in the entire bath, but rather stayed in the close vicinity of sperm and thus likely acted in an autocrine mode.

### **Activation of iPLA<sub>2</sub> $\beta$ precedes activation of mGX**

We have clearly shown above that inhibition of either iPLA<sub>2</sub> $\beta$  or mGX led to the inhibition of AR but whether the two PLA<sub>2</sub> are activated sequentially is unclear. In order to obtain a better insight of their time window of activation, sperm samples were treated with both LY and BEL inhibitors. When sperm were treated with both LY and BEL and AR triggered with 2  $\mu$ M P4, the kinetic of AR was very similar to that observed with BEL only during the first 15 min (Fig. 9A), confirming that mGX has no effect during the early phase of AR. On the other hand, the inhibition of both drugs were additive after 10-15 min (Fig. 9A), suggesting that mGX triggers AR only during the late phase of AR. At 10  $\mu$ M P4, we also compared the inhibition rate of AR measured from sperm treated with BEL alone and BEL + LY. When sperm were treated with BEL or with BEL + LY, as expected, there was only a slight inhibition of the rise of the P4-induced AR between 0 and 10 min. Nevertheless, the second phase of AR increase (>15 min) was clearly inhibited by LY (Fig. 9B).

### **Differential calcium signalling at low and high P4 concentrations**

We showed above that AR inhibition by iPLA<sub>2</sub> $\beta$  or mGX inhibitors is dependent on P4 concentration, strongly suggesting that different molecular pathways producing AR are activated at low or high P4 concentrations. Because Ca<sup>2+</sup> plays a central role in AR, different pathways may be driven by different early calcium signalling. Kobori et al showed indeed that low or high P4 concentrations activated different Ca<sup>2+</sup> response in mouse sperm: sperm exhibiting only transient calcium increase for [P4]<5  $\mu$ M contrary to [P4]>10  $\mu$ M, where both transient and long lasting calcium increases were observed (Kobori *et al.*, 2000). Several calcium signalling pathways were showed to be involved in P4-induced AR, including Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release including the cascade PLC $\delta$ 4, IP3R and store operated channels (Fukami et al., 2003; Jungnickel et al., 2001; O'Toole et al., 2000; Stambouliau et al., 2005). In order to assess a possible differential role of Ca<sup>2+</sup> release/Ca<sup>2+</sup> influx in signalling pathways activated at low or high P4, we followed the kinetic of P4-induced AR of sperm incubated either in medium containing U73122, a PLC inhibitor known to inhibit AR (O'Toole *et al.*, 2000) or in medium containing zero Ca<sup>2+</sup> (M16 medium deprived of nominal Ca<sup>2+</sup>) or in medium containing U73122 and zero Ca<sup>2+</sup>.

At low P4 concentration, both zero Ca<sup>2+</sup> medium and U73122 significantly slowed down the AR onset (Fig. 10A, black circles versus green triangles/blue diamonds,  $p < 0.005$  at 15 min), suggesting that Ca<sup>2+</sup> signalling during the early phase of AR is mediated by PLC and Ca<sup>2+</sup> influx. However, U73122 was unable to inhibit the late phase of AR, contrary to zero Ca<sup>2+</sup> medium (Fig. 10A, green triangles versus blue diamonds), suggesting that the late phase of AR is dependent on Ca<sup>2+</sup> influx only. At high P4 concentration, the inhibition profile is quite different. U73122 did not inhibit the early phase of AR but rather the late phase (Fig. 10B, black circles versus green triangles,  $p < 0.0001$  at 30 min), suggesting that Ca<sup>2+</sup> influx is the central actor of the early phase of AR and that PLC activation boosts the late phase of AR only. The central role of Ca<sup>2+</sup> influx during the AR onset was clearly shown by the AR inhibition in zero Ca<sup>2+</sup> medium (Fig. 10B, blue diamonds). Remarkably, the late activation of PLC was confirmed in zero Ca<sup>2+</sup> medium when U73122 was added in the medium (Fig. 10B, blue diamonds versus purple squares 20-30 min,  $p < 0.01$  at 30 min). Similar to what was observed with PLA<sub>2</sub> inhibitors, these results indicate that sperm AR occurring during the early and late phases relies on different Ca<sup>2+</sup> signalling and that different Ca<sup>2+</sup> pathways are activated at different P4 concentrations.

Finally, because P4 also activates Casper (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011), a possible differential role of Catsper at low or high P4 was assessed by comparing the rate of P4-induced AR of capacitated sperm treated with or without NCC, a compound known to be a potent inhibitor of Catsper. Remarkably, no inhibition was observed at 2 and 10  $\mu$ M P4, suggesting that this channel is not involved in P4-induced AR in mouse sperm (supplementary Fig. 4).

## Discussion

### 1/iPLA<sub>2</sub>β and mGX sPLA<sub>2</sub> but not cPLA<sub>2</sub>α are involved in AR

The importance of phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) activity in sperm acrosome reaction (AR) was demonstrated several decades ago (reviewed in (Roldan and Shi, 2007)). However, the molecular identity of the involved PLA<sub>2</sub>s and their number were not determined because 1/ the diversity of PLA<sub>2</sub> enzymes was unsuspected and 2/ specific inhibitors were unavailable (Dennis *et al.*, 2011). Herein, we challenged the involvement of 3 different PLA<sub>2</sub>s iPLA<sub>2</sub>β, group X sPLA<sub>2</sub> and cPLA<sub>2</sub>α in mouse AR by using specific inhibitors and the corresponding knock-out mice. Concerning the specificity of the used inhibitors, it is worth noting that the specificity of both iPLA<sub>2</sub>β and sPLA<sub>2</sub> inhibitors was validated by their lack of inhibition in the corresponding KO sperm. Moreover, LY does not inhibit iPLA<sub>2</sub>β, since LY has no effect on SAR, contrary to BEL and FKGL18, two iPLA<sub>2</sub>β inhibitors. Similarly BEL does not inhibit recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> (data not shown). All these results validate our pharmacological study performed with these two compounds. In the other hand, we showed that Pyr-1 at 2 μM was not specific and inhibited also iPLA<sub>2</sub>β. Altogether, from pharmacological data and study of AR of sperm from three different PLA<sub>2</sub> knock-out mouse strains, we demonstrated that iPLA<sub>2</sub>β and group X sPLA<sub>2</sub> are involved in P4-induced AR in mouse sperm. In the other hand, cPLA<sub>2</sub>α is involved neither in capacitation or AR. Although the presence of other PLA<sub>2</sub>s cannot be ruled out, the probability of their contribution in AR is very low. Concerning the sPLA<sub>2</sub>, the fact that LY, a pan sPLA<sub>2</sub> inhibitor, was fully ineffective in mGX KO sperm demonstrates that no other sPLA<sub>2</sub>s presenting enzymatic activity are present in mouse sperm, as previously demonstrated (Escoffier *et al.*, 2010). Concerning the other members of the iPLA<sub>2</sub> (γ, δ, ε, ζ, η) and cPLA<sub>2</sub> (β, γ, δ, ε, ζ) groups, their expression in testis was not found (Dennis *et al.*, 2011) and are thus unlikely involved in AR. Nevertheless, the presence of other phospholipases generating lipid mediators is not excluded. Indeed, PLA<sub>1</sub> is present in sperm (Hiramatsu *et al.*, 2003) and PLB is activated during AR (Asano *et al.*, 2013), possibly explaining why some sperm were still able to perform AR while iPLA<sub>2</sub>β and mGX were inhibited (Fig. 9).

## **2/ Studying P4-induced AR kinetic provides new insights on AR actors: different subpopulations are activated by different mechanisms**

Most of the studies performed on molecular pathways involved during AR focus either on the first minutes of the AR (O'Toole et al., 2000; Rockwell and Storey, 2000; Son and Meizel, 2003) or on the final rate obtained after 20-30 min (Asano et al., 2013; Fukami et al., 2003; Pietrobon et al., 2005). Only few studies presented kinetic data, mainly on a single cell basis, and thus focusing on fast responding cells (Buffone et al., 2009; Harper et al., 2008; Sosa et al., 2015). However, the exocytosis of the acrosomal vesicle is much more complicated than that of a neuronal granule, which releases its content into the synaptic cleft within msec. First and contrary to neuronal granules, the docking of the outer acrosomal membrane on the plasma membrane is incomplete, and requires modifications of its structure including deep invaginations allowing tight appositions to the plasma membrane (Sosa et al., 2015; Zanetti and Mayorga, 2009). Moreover, both membranes are arranged in loose trans-SNARE complexes, requiring at least Munc18-1 for complete assembly (Rodriguez *et al.*, 2012). Second, acrosomal exocytosis requires the fusion of both membranes in multiple points, generating heterogeneous vesicles (Barros *et al.*, 1967). Third, the full release of the acrosomal content is slow, partly because enzymes are embedded in the acrosomal matrix (Harper et al., 2008; Kim et al., 2001). The release of the different compounds seems indeed dependent on their size and their interaction with acrosomal matrix. For instance, EGFP protein is quickly released, in about 10 seconds range in acro-EGFP transgenic mice (Buffone et al., 2009; Nakanishi et al., 1999), contrary to acrosin, which binds over minutes (Kim et al., 2001). Numerous tests were developed / used to study AR and assess the role of the different actors during the different stages. Early events like calcium signaling, pH changes or release of small compounds were studied using calcium or pH imaging, fluorescence decrease or immunostaining. Although these techniques allowing deciphering the involvement of numerous actors, they provide only a partial vision of the event, being given that AR is long lasting event (Fig. 3). Herein we chose to follow the full release of the acrosomal vesicle evidenced by Coomassie blue staining as AR outcome. We showed that this method can discriminate different phases in AR, with very sensitive subpopulations completing their AR in less than 5 min, and others requiring up to 30 minutes to complete AR. The presence of sperm subpopulations with different degrees of maturity after capacitation completion is well documented (Cohen-Dayag et al., 1995; Perreault and Rogers, 1982; Zalata et al., 2009). Herein, we show for the first time that these subpopulations do not rely on the same molecular



pathways to achieve AR. At 2  $\mu$ M P4, a concentration close to physiological concentration inside the cumulus, we show that inhibition of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  by BEL blocked the fast responding subpopulation (Fig. 6A and 9A). For this subpopulation, mGX activity was not necessary because 1/ LY alone had no effect and 2/the initial rise of AR rate in mGX KO sperm was similar to that of WT sperm (Fig. 7A). Moreover, during the phase 5-10 min, both drugs were not additive (Fig. 9A), strongly suggesting again that mGX is not involved in the early phases of AR. Interestingly, between 5 and 15 min, the slope of the increase of AR in the presence of BEL was lower (Fig. 6A), showing that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibition partially blocked AR and thus suggests that early lipid hydrolysis by iPLA<sub>2</sub> $\beta$  was responsible of the acceleration of AR increase, significantly observed between 5 and 15 min in control conditions. In contrast, mGX inhibition by LY led to a strong block of AR after 10-15 min (Fig. 7A and 9A), demonstrating the key role of this enzyme in the late phase. Ca<sup>2+</sup> mobilization pathways were similarly different between the early and the late phases. The early phase was significantly inhibited by U73122, contrary to the late phase, which was strongly dependent to Ca<sup>2+</sup> influx (Fig. 10A).

We can thus propose that at low P4 concentration, sperm achieving their AR early rely only on iPLA<sub>2</sub> $\beta$  activation associated with a Ca<sup>2+</sup> signalling involving likely PLC $\delta$ 4 and a Ca<sup>2+</sup> influx, whereas sperm achieving their AR late rely mainly on mGX sPLA<sub>2</sub> activation and a Ca<sup>2+</sup> influx.

At low P4 concentrations (< 1 $\mu$ M), inhibition of mGX sPLA<sub>2</sub> by LY led to an almost complete inhibition of AR (Fig. 7C). This result suggests that the expected synergy between P4-induced Ca<sup>2+</sup> increase and fusogenic lipids produced by iPLA<sub>2</sub> $\beta$  is not sufficient to trigger a full AR, but rather produce transitional states of acrosomal exocytosis, allowing transient opening of pores only. Those pores can open and close before final loss of the acrosome (Kim et al., 2011). During this transient period, sperm visually appear to be "acrosome-intact" sperm. The inhibition of mGX, likely through these pores, may prevent their complete opening and pores return back to closed state, leading to a block of AR.

### **3/ The contribution of PLA<sub>2</sub> is dependent on P4 concentration**

Remarkably, the potencies of PLA<sub>2</sub> inhibitors on AR were dependent of P4 concentration. At low P4 concentration, the initial phase (0-10 min) was strongly dependent on the iPLA<sub>2</sub> $\beta$  activity (Fig. 6A). At high P4 concentration, inhibition of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  or its absence decreased only slightly the AR (Fig. 6B and supplementary Fig. 3), especially when sperm were

incubated with BEL from the beginning of the capacitation (Fig. 6A). Similarly, mGX inhibition produced a nearly complete inhibition (> 90%) of P4-induced AR at [P4]<1  $\mu$ M and weaker inhibition at 10  $\mu$ M P4 (~50%) (Fig. 7C). AR induced by low P4 concentrations is thus strongly PLA<sub>2</sub>-dependent. Moreover, these results suggest that there are alternative pathways allowing bypassing the lack of fusogenic lipids produced by iPLA<sub>2</sub> $\beta$  or mGX at high P4 concentration. Ca<sup>2+</sup> plays a central role in AR and Kobori et al showed that low or high P4 concentrations activates different a Ca<sup>2+</sup> response: for [P4]<5  $\mu$ M sperm exhibiting only transient calcium increase contrary to [P4]>10  $\mu$ M, where both transient and long lasting calcium increases were observed (Kobori *et al.*, 2000). Moreover, we showed that PLC plays a central role in AR onset only at low P4 concentration (Fig. 10A). We can thus postulate, that Ca<sup>2+</sup> signaling involving PLC and triggered by low [P4] is able to initiate AR in a primed sperm subpopulation only in conjunction with the production of fusogenic lipid by iPLA<sub>2</sub> $\beta$ . At high [P4], AR onset rely on a Ca<sup>2+</sup> influx, which can trigger AR without fusogenic lipids or with a different set of fusogenic lipids, which could be produced by PLB (Asano *et al.*, 2013) or PLA1 (Hiramatsu et al., 2003). Alternatively, P4 at high concentration may bind to a different receptor (Correia *et al.*, 2007) and activate a different pathway.

Importantly, we showed that physiological P4 concentration is closer to 1 than 10  $\mu$ M (Fig. 3) and our results clearly indicate that under physiological conditions, both iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and group X sPLA<sub>2</sub> are likely activated during mouse sperm AR. We also showed that calcium signaling was also dependent to the [P4] (Fig. 10AB). From these conclusions, results based on A23187-induced AR (i.e involving a huge calcium concentration increase) and showing that AR does not rely on PLA<sub>2</sub> activity should be evaluated with caution (Anderson, Jr. *et al.*, 1990). Overall, our results indicate that different molecular pathways are activated by different P4 concentrations during AR, and thus that [P4] is a key factor, which should be taken into account in P4-induced AR studies.

#### **4/ Activation of PLA<sub>2</sub> during capacitation**

We show that SAR occurring during the 65 min of the capacitation period was inhibited only by iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibitors, and not by sPLA<sub>2</sub> inhibitor (Fig. 1C). The involvement of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  in SAR is confirmed by the absence of SAR in sperm from iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO males (Fig. 1B). It is worth noting that non capacitated sperm from iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO males presented a higher level of

acrosome reacted sperm than non capacitated sperm from cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  and mGX KO males. Although not described in the first report on the fertility of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO males (Bao et al., 2004), iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO mice are teratozoospermic, with around 50% of sperm presenting a defective head (data not shown). This result suggests that the absence of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  may lead to a defective spermiogenesis, which accounts for the high level of acrosome reacted sperm in epididymis. We previously showed that LY does not modify phosphatidylserine distribution and SAR at 45 min, confirming that mGX is not involved in the SAR occurring during the first 45 min (Escoffier et al., 2010; Escoffier et al., 2011). Nevertheless, these parameters were modified by LY at 90 min of capacitation. Altogether, these results show that SAR does not rely on the same molecular pathway all along the capacitation process, the early phase being iPLA<sub>2</sub> $\beta$  dependent and the late phase sPLA<sub>2</sub>-dependent. The similarity with P4-induced AR is striking.

Interestingly SAR and the AR onset triggered by low [P4] present similar pharmacological profile, SAR and P4-induced AR relying on iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , PLC and Ca<sup>2+</sup> influx. We can thus postulate that these sperm belong to a unique subpopulation and that low P4 synchronizes SAR in a similar way than depolarization and Ca<sup>2+</sup> influx synchronizes neuronal granules exocytosis.

Remarkably, when sperm were treated with BEL from the beginning of the capacitation, the inhibition of SAR did not modify the final rate of AR at 30 min in comparison to sperm treated after capacitation (Fig. 6A). This result suggests that the subpopulation of sperm which should have achieved their AR during capacitation were primed and were waiting for a cofactor to achieve AR, which may be a lipid mediator produced by sPLA<sub>2</sub> at low P4 concentration. This result confirms that both Ca<sup>2+</sup> and lipidic signaling are necessary for AR at physiological P4 concentrations.

**In conclusion,** Progesterone-induced AR is a long lasting event, spreading over 30 min in mouse, and by performing kinetic analysis, we revealed new insight on AR and showed the presence of different sperm subpopulations, which did not rely on the same molecular pathways to achieve their AR. At low P4 concentration, sperm achieving their AR early (0-10 min post progesterone) rely only on iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , whereas sperm achieving their AR lately (15-30 min post progesterone) relies mainly on mGX sPLA<sub>2</sub>. We thus showed that AR is not an homogenous molecular process and changes over time. Moreover, we showed that PLA<sub>2</sub>

activation depends upon P4 concentrations, PLA<sub>2</sub> being key actors at low P4 concentrations close to physiological concentration ( $< 2\mu\text{M}$ ) and less central at higher P4 concentrations above  $10\ \mu\text{M}$ , suggesting that future studies focusing on P4-induced AR should take into account this important parameter .

## Materials and methods

### Biological preparation

All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the local Ethical Review Committee “Agreement N° 296-Grenoble-Institut des Neurosciences-Ethical committee”. mGX-KO mice (null for *PLA<sub>2</sub>g10* gene) on a C57BL/6J background were obtained from Lexicon Inc. as described (Henderson, Jr. *et al.*, 2007). cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO mice (null for *PLA<sub>2</sub>g4a* gene) were obtained as described (Bonventre *et al.*, 1997). iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO mice (null for *PLA<sub>2</sub>g6a* gene) were obtained as described (Bao *et al.*, 2004). All other mice (OF1 strain) were from Charles River laboratories (Les Oncins, France). All animals used were 2- to 6-months old.

### Capacitation and AR triggering

Mouse sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymides, were allowed to swim in M2 medium for 10 minutes. Sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid-free BSA at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator during 65 min. For experiments in low free [Ca<sup>2+</sup>], the capacitation medium was M2 medium supplemented with 20 mM NaHCO<sub>3</sub> and 1.45 mM EGTA for 200  $\mu$ M free Ca<sup>2+</sup> or 1.58 mM EGTA for 100  $\mu$ M free Ca<sup>2+</sup> and sperm were capacitated at 37°C in an air incubator. Free Ca<sup>2+</sup> concentrations were determined with the Alex program (Vivaudou *et al.*, 1991), assuming a concentration of total contaminant calcium of 25  $\mu$ M in solutions deprived of nominal Ca<sup>2+</sup> salts.

For progesterone (P4) treatment, capacitated sperm (35 min) were incubated with P4 in M16 medium at 37°C for the last 30 min of capacitation (total duration of the experiment 65 min). Control experiments were always performed with the same concentration of DMSO in the medium (DMSO concentrations ranging from 0.01 to 0.1%).

### AR assay

Sperm were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 5 minutes. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 minutes), wet mounted on slides, and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2

minutes and finally rinsed. Slides were analysed, and at least 150 sperm were scored per condition.

#### **Preparation of the cumulus–oocyte complex-conditioned medium for enzyme immunoassay.**

Eggs were collected from mature OF1 females (6 weeks old) synchronized with 5 units of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and 5 units of human chorionic gonadotrophin (hCG). Cumulus–oocyte complexes harvested from 10 mice were placed in 250 µl M16 medium and incubated for 0, 1 and 2 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Incubations were stopped by centrifugation at 5,000 g for 10 min and the supernatant and the pellet were frozen and used to determine the concentration of progesterone using a radioimmunoassay. The concentration of progesterone was also assayed in plasma of the animals.

#### **Determination of progesterone concentrations**

Progesterone concentrations were determined by radioimmunoassay using <sup>125</sup>I-labelled progesterone (IBL international, Hamburg, Germany). The RIA's detection limit was calculated to range between 0.1 and 0.5 ng/ml, i.e. between 0.3 and 1.6 nM depending upon the labelling lot. Cross-reactivity with other steroid hormones was reported to be minimal: < 3.5 % for 20β-dihydroprogesterone and 5α-pregnane-3,20-dione, 1.5 % for 17α-hydroxyprogesterone, 0.8 % for 11-deoxycorticosterone, < 0.4 % for pregnenolone and corticosterone and ≤ 0.1 % for all other steroid hormones tested by the manufacturer.

Briefly, the cumulus pellets were extracted with diethyl ether and centrifuged to remove cell debris. The supernatant was evaporated under nitrogen and the residue was redissolved in 250 µl Tris buffer (10 mM, pH 7.4) containing 0.1 % BSA. Cumulus supernatants (250 µl) and plasmas were assayed directly according to the manufacturer's instructions. Progesterone levels were undetectable in the Tris/BSA buffer as well as in the M16 medium used for the incubations.

#### **SDS-PAGE and immunoblotting**

After treatment, sperm were collected by centrifugation, washed in 1 ml phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in Laemmli sample buffer without β-mercaptoethanol, and boiled for 5 minutes. After centrifugation, 5% β-mercaptoethanol was added to the supernatants, and the mixture was boiled again for 5 minutes. Protein extracts equivalent to 1–2 x 10<sup>6</sup> sperm were loaded per lane and subjected to SDS-PAGE, using gradient 4–20 % acrylamid gels (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and electro-transferred to PVDF membranes

(Immobilin-P, Millipore, Molsheim, France) at 250 mA for 60 min on ice. Membranes were treated with 20% fish skin gelatin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) in PBS-T, then incubated for one hour at room temperature with primary antibody Anti-Phosphotyrosine Antibody (clone 4G10, Millipore, Molsheim, France) diluted in T-TBS (1/10,000). The membrane was washed in PBS-T and probed with secondary antibody horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1/10000) for one hour at room temperature. Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chimidoc<sup>TM</sup> Station (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Western blotting procedures were repeated at least 3 times per sample.

### **Calcium imaging**

Sperm were first loaded with 5  $\mu$ M of the calcium indicator Fluo4-AM (Molecular probes, Interchim, Montluçon, France) by a 30 min incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in a solution A containing (in mM): NaCl (109), KCl (4.78), MgCl<sub>2</sub> (1.19), CaCl<sub>2</sub> (1.71), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.19), NaHCO<sub>3</sub> (10), Hepes (25), Sodium lactate (25), sodium pyruvate (1), glucose (5.56), 0.05% pluronic acid and BSA 0.1% .

After capacitation, sperm were centrifuged and re-suspended in the solution A without BSA and pluronic acid and kept at 37°C until imaging experiment. 100  $\mu$ l aliquots of capacitated sperm cells ( $6 \times 10^6$  /ml) were transferred to an imaging chamber, in which the lower surface was a glass coverslip treated with Cell-Tak (Beckton-Dickinson, Claix, France). The chamber was then connected to the perfusion apparatus and at least 10 ml of fresh medium was washed through. All experiments were carried out at 37° C in a continuous flow of medium. Only sperm presenting a motile flagellum were studied. Cells were imaged on an inverted Nikon TE200U microscope, fitted with an X-cite 120 EXFO source. Images were acquired with an IXON ANDOR TE885KCS-VP camera and taken every second.

Data were processed offline using ANDOR IQ 1.3 software. Fluorescence was measured in the whole head of the sperm.

### **Detection of sPLA<sub>2</sub> proteins in sperm**

Sperm from caudae epididymes were allowed to swim for 15 min at 37°C in 2.5 ml of M2 medium. Sperm were then washed by centrifugation at 1,000 g twice with M2 medium, then resuspended in 2.5 ml of M16 medium. Five hundreds  $\mu$ l of sperm were then diluted in 4.5 ml of M16 medium containing 2% fatty acid free BSA and further incubated at 37°C for 90 min. A23187 Ca<sup>2+</sup> ionophore (5  $\mu$ M) was added between 60 and 90 min of incubation. After incubation, sperm were spun down for 8 min at 500 g, and supernatants and cell pellets were

flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. sPLA<sub>2</sub> protein and was analyzed on crude supernatants and cell pellets after resuspension in 500 µl of M16 medium containing a cocktail of protease inhibitors (EDTA-free complete inhibitor set, Roche Biochemicals) and lysis with a Branson 350 Sonifier Cell disrupter. Time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA) for sPLA<sub>2</sub> was performed as described with minor modification (Eerola *et al.*, 2006). Briefly, 1 to 5 µl of protein sample were diluted in 100 µl of Delfia assay buffer (Tris-HCl buffered NaCl solution, pH 7.8, containing NaN<sub>3</sub>, BSA, bovine gamma globulins, Tween 40, DTPA and inert red dye, Perkin Elmer Wallac) and added to sPLA<sub>2</sub> IgG-coated microtiter wells previously washed twice with TR-FIA washing solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.9% NaCl, 0.04% NaN<sub>3</sub> and 0.02% Tween 20). After incubation at room temperature with constant shaking at 200 cycles/min for 30 min, wells were washed four times with TR-FIA washing solution, incubated with 100 µl of Eu-labeled mGX IgG tracer (0.5 µg/ml diluted in Delfia Assay Buffer), and washed again four times as above. After washing, 100 µl of Delfia enhancement solution were added to wells, incubated at room temperature for 5 min with shaking at 200 cycles/min and thereafter for 10 min without shaking. Time-resolved fluorescence was measured using a Wallac Envision Perkin Elmer plate reader and optimized optical modules for DELFIA assays.

### **Production of sPLA<sub>2</sub> antibodies**

mGX sPLA<sub>2</sub> antibodies were produced in rabbit as polyclonal antibodies raised against the recombinant mGX sPLA<sub>2</sub>.

### **Chemical compounds.**

M2 medium, M16 medium, progesterone and BSA were from Sigma-Aldrich (Lyon, France). PMSG and HCG were from Intervet (Beaucouze, France), BEL from Interchim (Montluçon, France). Pyrrolidine-1 (Pyr-1), LY329722 and mGX antibody were provided by Pr. Michael Gelb (University of Washington, WA-USA) and FK GK18 by George Kokotos (University of Athens, Greece).

### **Statistics**

Statistical analyses were performed with SigmaPlot. t test and paired t test were used to compare the effect of various compounds on AR and fertility, respectively. Data represent mean ± SEM. Statistical tests with a 2-tailed P values ≤ 0.05 were considered significant.



## **Acknowledgments**

This work was supported in part by CNRS (to C.A. and G.L.), the Agence Nationale de la Recherche (to CA, ANR emergence, 2012 LUTINFER). We thank Lexicon Genetics Inc. for providing us mGX-deficient mouse and John Turk (university of Washington in St Louis, MI-USA), Miriam Kolko and Charlotte Taul Braendstrup (University of Copenhagen, Denmark) for providing iPLA<sub>2</sub>β deficient mice. We thank Pr. Michael Gelb (University of Washington, WA-USA) for providing LY329722 and Pr. George Kokotos (University of Athens, Greece) for FKGK18. We thank Virginie Pierre for help in calcium imaging experiments.

## Reference List

- Abi Nahed, R., Escoffier, J., Revel, C., Jeammet, L., Payre, C., Ray, P. F., Hennebicq, S., Lambeau, G. and Arnoult, C.** (2014). The effect of group X secreted phospholipase A2 on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A2 or progesterone. *Biochimie*. 99:88-95. doi: 10.1016/j.biochi.2013.11.012. Epub; 2013 Nov 25., 88-95.
- Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K. and Dennis, E. A.** (1995). Inhibition of macrophage Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J. Biol. Chem.* 270, 445-450.
- Ali, T., Kokotos, G., Magrioti, V., Bone, R. N., Mobley, J. A., Hancock, W. and Ramanadham, S.** (2013). Characterization of FKGK18 as inhibitor of group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 (iPLA2beta): candidate drug for preventing beta-cell apoptosis and diabetes. *PLoS. One.* 8, e71748.
- Anderson, R. A., Jr., Johnson, S. K., Bielfeld, P., Feathergill, K. A. and Zaneveld, L. J.** (1990). Characterization and inhibitor sensitivity of human sperm phospholipase A2: evidence against pivotal involvement of phospholipase A2 in the acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 27, 305-325.
- Asano, A., Nelson-Harrington, J. L. and Travis, A. J.** (2013). Phospholipase B is activated in response to sterol removal and stimulates acrosome exocytosis in murine sperm. *J. Biol. Chem.* 288, 28104-28115.
- Bao, S., Miller, D. J., Ma, Z., Wohltmann, M., Eng, G., Ramanadham, S., Moley, K. and Turk, J.** (2004). Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 279, 38194-38200.
- Barros, C., Bedford, J. M., Franklin, L. E. and Austin, C. R.** (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell Biol.* 34, C1-C5.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M.** (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317-324.
- Bonventre, J. V., Huang, Z., Taheri, M. R., O'Leary, E., Li, E., Moskowitz, M. A. and Sapirstein, A.** (1997). Reduced fertility and postischemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature*. 390, 622-625.
- Buffone, M. G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B. T. and Gerton, G. L.** (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J. Cell Physiol.* 220, 611-620.
- Cohen, R., Buttke, D. E., Asano, A., Mukai, C., Nelson, J. L., Ren, D., Miller, R. J., Cohen-Kutner, M., Atlas, D. and Travis, A. J.** (2014). Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. *Dev. Cell.* 28, 310-321.

- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. and Eisenbach, M.** (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11039-11043.
- Correia, J. N., Conner, S. J. and Kirkman-Brown, J. C.** (2007). Non-genomic steroid actions in human spermatozoa. "Persistent tickling from a laden environment". *Semin. Reprod. Med.* 25, 208-219.
- Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y. H., Magrioti, V. and Kokotos, G.** (2011). Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130-6185.
- Eerola, L. I., Surrel, F., Nevalainen, T. J., Gelb, M. H., Lambeau, G. and Laine, V. J.** (2006). Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761, 745-756.
- Escoffier, J., Jemel, I., tanemoto, A., Taketomi, Y., Payre, C., Coatrieux, C., Sato, H., Yamamoto, K., Masuda, S., Pernet-Gallay, K. et al.** (2010). Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1415-1428.
- Escoffier, J., Pierre, V., Jemel, I., Munch, L., Boudhraa, Z., Ray, P. F., De Waard, M., Lambeau, G. and Arnoult, C.** (2011). Group X secreted phospholipase A2 specifically decreases sperm motility in mice. *J. Cell Physiol.* 226, 2601-2609.
- Fleming, A. D. and Yanagimachi, R.** (1984). Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229, 485-489.
- Florman, H. M., Jungnickel, M. K. and Sutton, K. A.** (2008). Regulating the acrosome reaction. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 503-510.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K. and Takenawa, T.** (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* 161, 79-88.
- Ghomashchi, F., Stewart, A., Hefner, Y., Ramanadham, S., Turk, J., Leslie, C. C. and Gelb, M. H.** (2001). A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A(2)alpha blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1513, 160-166.
- Harper, C. V., Cummerison, J. A., White, M. R., Publicover, S. J. and Johnson, P. M.** (2008). Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J. Cell Sci.* 121, 2130-2135.
- Henderson, W. R., Jr., Chi, E. Y., Bollinger, J. G., Tien, Y. T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y. P., Singer, A. G., Chiang, G. K., Nevalainen, T. et al.** (2007). Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 204, 865-877.
- Hiramatsu, T., Sonoda, H., Takanezawa, Y., Morikawa, R., Ishida, M., Kasahara, K., Sanai, Y., Taguchi, R., Aoki, J. and Arai, H.** (2003). Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipase A1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J. Biol. Chem.* 278, 49438-49447.
- Hui, D. Y.** (2012). Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases. *Curr. Opin. Lipidol.* 23, 235-240.

- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M.** (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R. and Florman, H. M.** (2001). Trp2 regulates entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.* 3, 499-502.
- Jungnickel, M. K., Sutton, K. A., Wang, Y. and Florman, H. M.** (2007). Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. *Dev. Biol.* 304, 116-126.
- Kim, K. S., Foster, J. A. and Gerton, G. L.** (2001). Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol. Reprod.* 64, 148-156.
- Kim, K. S., Foster, J. A., Kvasnicka, K. W. and Gerton, G. L.** (2011). Transitional states of acrosomal exocytosis and proteolytic processing of the acrosomal matrix in guinea pig sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 930-941.
- Kobori, H., Miyazaki, S. and Kuwabara, Y.** (2000). Characterization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 63, 113-120.
- Li, K., Jin, J. Y., Chen, W. Y., Shi, Q. X., Ni, Y. and Roldan, E. R.** (2012). Secretory Phospholipase A2 Group IID is Involved in Progesterone-induced Acrosomal Exocytosis of Human Spermatozoa. *J. Androl.* 33, 975-983.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. and Kirichok, Y.** (2011). Progesterone activates the principal  $\text{Ca}^{2+}$  channel of human sperm. *Nature.* 471, 387-391.
- Llanos, M. N., Morales, P. and Riffo, M. S.** (1993). Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J. Exp. Zool.* 267, 209-216.
- Meizel, S. and Turner, K. O.** (1983). Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 161, 315-318.
- Murakami, M. and Lambeau, G.** (2013). Emerging roles of secreted phospholipase A(2) enzymes: an update. *Biochimie.* 95, 43-50.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T. and Yamamoto, K.** (2011). Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans. *Prog. Lipid Res.* 50, 152-192.
- Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y. and Okabe, M.** (1999). Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett.* 449, 277-283.
- Nevalainen, T. J., Eerola, L. I., Rintala, E., Laine, V. J., Lambeau, G. and Gelb, M. H.** (2005). Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1733, 210-223.
- O'Toole, C. M., Arnoult, C., Darszon, A., Steinhardt, R. A. and Florman, H. M.** (2000).  $\text{Ca}^{2+}$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* 11, 1571-1584.
- Perreault, S. D. and Rogers, B. J.** (1982). Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 38, 258-260.

- Pietrobon, E. O., Soria, M., Dominguez, L. A., Monclus, M. L. and Fornes, M. W.** (2005). Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 58-63.
- Rockwell, P. L. and Storey, B. T.** (2000). Kinetics of onset of mouse sperm acrosome reaction induced by solubilized zona pellucida: fluorimetric determination of loss of pH gradient between acrosomal lumen and medium monitored by dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide and of intracellular Ca(2+) changes monitored by fluo-3. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 335-349.
- Rodriguez, F., Zanetti, M. N., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2012). Munc18-1 controls SNARE complex assembly during human sperm acrosomal exocytosis. *J. Biol Chem.* 287, 43825-43839.
- Roldan, E. R. and Fragio, C.** (1993). Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca2+/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 268, 13962-13970.
- Roldan, E. R., Murase, T. and Shi, Q. X.** (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* 266, 1578-1581.
- Roldan, E. R. and Shi, Q. X.** (2007). Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* 12, 89-104.
- Schevitz, R. W., Bach, N. J., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Dillard, R. D., Draheim, S. E., Hartley, L. W., Jones, N. D., Mihelich, E. D. et al.** (1995). Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A2. *Nat. Struct. Biol.* 2, 458-465.
- Shi, Q. X., Chen, W. Y., Yuan, Y. Y., Mao, L. Z., Yu, S. Q., Chen, A. J., Ni, Y. and Roldan, E. R.** (2005). Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J. Cell Physiol.* 205, 344-354.
- Shirai, Y., Balsinde, J. and Dennis, E. A.** (2005). Localization and functional interrelationships among cytosolic Group IV, secreted Group V, and Ca2+-independent Group VI phospholipase A2s in P388D1 macrophages using GFP/RFP constructs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1735, 119-129.
- Son, J. H. and Meizel, S.** (2003). Evidence suggesting that the mouse sperm acrosome reaction initiated by the zona pellucida involves an alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biol. Reprod.* 68, 1348-1353.
- Sosa, C. M., Pavarotti, M. A., Zanetti, M. N., Zoppino, F. C., De Blas, G. A. and Mayorga, L. S.** (2015). Kinetics of human sperm acrosomal exocytosis. *Mol. Hum. Reprod.* 21, 244-254.
- Stambouliau, S., Moutin, M. J., Treves, S., Pochon, N., Grunwald, D., Zorzato, F., De Waard, M., Ronjat, M. and Arnoult, C.** (2005). Juncate, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels. *Dev. Biol.* 286, 326-337.
- Strunker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. and Kaupp, U. B.** (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca2+ influx in human sperm. *Nature.* 471, 382-386.
- Thakkar, J. K., East, J., Seyler, D. and Franson, R. C.** (1983). Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 754, 44-50.

**Thomas, P. and Meizel, S.** (1989). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent upon  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem. J.* 264, 539-546.

**Tsai, P. S., Brewis, I. A., van Maaren, J. and Gadella, B. M.** (2012). Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis. *PLoS. One.* 7, e32603.

**Vivaudou, M. B., Arnoult, C. and Villaz, M.** (1991). Skeletal muscle ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels recorded from sarcolemmal blebs of split fibers: ATP inhibition is reduced by magnesium and ADP. *J. Membr. Biol.* 122, 165-175.

**Zalata, A., Hassan, A., Christophe, A., Comhaire, F. and Mostafa, T.** (2009). Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int. J. Androl.* 33, 528-535.

**Zanetti, N. and Mayorga, L. S.** (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 81, 396-405.

## Legend of Figures

**Fig. 1 iPLA<sub>2</sub>β controls spontaneous AR occurring during capacitation.** (A) AR was assessed by Coomassie blue staining method, non acrosome reacted sperm presenting a dark blue crescent (black arrow heads), contrary to acrosome reacted sperm (white arrow heads). (B) Capacitation did not lead to an increase of the rate of spontaneous AR of sperm from iPLA<sub>2</sub>β KO males, contrary to sperm from mGX and cPLA<sub>2</sub>α KO males. Epididymal sperm were incubated either in medium not supporting capacitation (M2 medium containing 0.1% BSA) or in a medium supporting capacitation (M16, 2% BSA) for 65 min, and the % of acrosome reacted sperm counted (n=4). (C) Effects of PLA<sub>2</sub> inhibitors on spontaneous AR: BEL and FKGK but not LY329722 (LY) inhibited spontaneous AR. The % of acrosome reacted sperm was measured before capacitation (Non capa) or at the end of the capacitation period (Capa) without PLA<sub>2</sub> inhibitors or in the presence of BEL (10 μM, n=5), FKGK (10 μM, n=3) or LY (1 μM, n=5). (D) Effect of BEL on the appearance of the hallmark of capacitation, protein tyrosine phosphorylations. BEL treatment did not modify phosphotyrosine containing proteins (n=2).

**Fig. 2 Calcium dependence of spontaneous AR.** (A) Sperm were incubated for 65 min in a non capacitating medium (M2 medium containing 0.1% BSA, n=20, white bar), a capacitating medium (M16 medium containing 2% BSA n=20, black bar), or a capacitating medium containing 100 μM, 200 μM free [Ca<sup>2+</sup>] (n=6) or an inhibitor of PLC (U73122, n=8) and the rate of spontaneous AR measured. (B) Examples of slow Ca<sup>2+</sup> oscillations recorded during capacitation of sperm loaded with fluo-4 calcium dye. Each curve corresponds to the normalized variation of fluorescence (F) measured in the head of a single spermatozoon (C) The number of cells presenting Ca<sup>2+</sup> oscillations was increased by capacitation from 11% to

50 %. **(D)** In absence of external  $\text{Ca}^{2+}$  in the capacitating medium,  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations of sperm were abolished. Each curve corresponds to the normalized variation of fluorescence (F) measured in the head of a single spermatozoon.

**Fig. 3. Characterization of P4-induced acrosome reaction (AR) in mouse.** **(A)** Dose response curve of AR to progesterone concentration ([P4]). Mouse sperm were capacitated during 35 min and treated with different [P4] during 30 min, and the % of acrosome reacted sperm was determined by coomassie blue staining, n=5. **(B)** Determination of ex-vivo [P4] in mouse cumulus oophorus. Harvested cumulus were incubated for different durations in M16 medium at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  and after centrifugation [P4] was measured in the cumulus (pellet) or in the incubating medium (supernatant) at 0 (n=1), 60 (n=1) and 120 min (n=4). **(C)** Kinetic of P4-induced AR of WT sperm. After 35 min of capacitation, P4 at 2  $\mu\text{M}$  (green triangles, n=12) or 10  $\mu\text{M}$  (red circles, n=12) was introduced in the capacitating medium (time 0) and the % of AR was followed during 50 min. Black circles correspond to the % of AR of sperm in similar condition (0.01-0.1 % DMSO without P4).

**Fig. 4. Potency of different  $\text{PLA}_2$  inhibitors on mouse sperm acrosome reaction.** Mouse sperm were capacitated during 35 min and AR triggered with 2 or 10  $\mu\text{M}$  P4 during 30 min, and the % of acrosome reacted sperm was measured in the presence or absence of  $\text{iPLA}_2\beta$  (BEL, (10  $\mu\text{M}$ ) or FKGK18 (10  $\mu\text{M}$ )),  $\text{sPLA}_2$  (LY329722 (1  $\mu\text{M}$ )) or  $\text{cPLA}_2$  (Pyrrolidine-1 (1  $\mu\text{M}$ )) inhibitors (n=3).

**Fig. 5. P4-induced AR in  $\text{iPLA}_2\beta$ , mGX  $\text{sPLA}_2$  or  $\text{cPLA}_2\alpha$  KO mice.** **(A-C)** Sperm from  $\text{iPLA}_2\beta$  KO (A), mGX  $\text{sPLA}_2$  KO (B) or  $\text{cPLA}_2\alpha$  KO mice (C) were capacitated during 35 min and AR triggered with P4 during 30 min. The % of acrosome reacted sperm was then measured before capacitation (Non capa), at the end of the entire capacitation period (Capa,



without P4) or after P4 treatment at 2 or 10  $\mu$ M P4, and compared to values obtained with WT littermates control mice (n=3-5). **(D-F)** Potency of BEL, LY329722 and Pyrrolidine-1 on AR of sperm from iPLA<sub>2</sub> $\beta$  KO (D), mGX sPLA<sub>2</sub> KO (E) or cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  KO (F) mice, respectively. Sperm were capacitated during 35 min and AR triggered with P4 during 30 min. The % of acrosome reacted sperm was then measured before capacitation (Non capa), at the end of the entire capacitation period (Capa, without P4) and after P4 treatment at 2 or 10  $\mu$ M P4 in the presence or absence of 10  $\mu$ M BEL (D), n=3, 1  $\mu$ M LY329722 (E), n=3 or 1  $\mu$ M Pyrrolidine-1 (F), n=3.

**Fig. 6. Kinetic of AR inhibition by the iPLA<sub>2</sub> $\beta$  inhibitor BEL.** (A) After 35 min of capacitation, 2  $\mu$ M P4 was introduced in the capacitating medium (time 0) and the % of AR was followed during 30 min. BEL (10  $\mu$ M) was introduced either at the beginning (green triangles, n=3) or at the end (red circles, n=3) of the capacitation period. Black squares correspond to the kinetic of P4-induced AR of WT sperm measured in absence of BEL (n=12). It is worth noting that inhibition of the spontaneous AR by BEL, when introduced at the beginning of the capacitation, is clearly evidenced by the shift of the curve at t=0 (green triangles). (B) Similar experiments performed with 10  $\mu$ M P4 (n=3). Similar shift is observed.

**Fig. 7. Kinetic of AR inhibition by the sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722 (LY).** (A) After 35 min of capacitation, 2  $\mu$ M P4 was introduced in the capacitating medium (time 0) and the % of AR was followed during 30 min. LY329722 (1  $\mu$ M) was introduced at the beginning of the capacitation period (green square, n=3). Sperm from mGX KO mice presented a similar kinetic of AR (red circles, n=3). Black squares correspond to the kinetic of P4-induced AR of WT sperm measured in absence of LY329722 (n=12). AR rate was expressed at the % of sperm achieving AR during the P4 period only. (B) Similar experiments performed with 10  $\mu$ M P4. (C) Potency of AR inhibition by LY329722 changes in function of progesterone concentration. AR in the presence (white columns) or in absence (black columns) of

LY329722 (1  $\mu$ M) was measured at 0.1, 0.5, 1, 2 and 10  $\mu$ M P4 (n=3, difference between P4 and P4+inhibitor was significant  $p<0.001-0.0001$ ). The red dash line indicates the level of spontaneous AR.

**Fig. 8. mGX sPLA<sub>2</sub> acts in an autocrine mode during P4-induced AR.** (A, B). LY329722 (LY) and mGX antibodies inhibited similarly the P4-induced AR at 2 and 10  $\mu$ M (n=3). (C) Recombinant mGX did not trigger AR at 0.02 nM. Capacitated sperm were incubated with 0.02 or 0.2 nM recombinant mGX for 30 min and AR was assessed. (D) P4-induced AR kinetic did not depend of sperm concentration. After 35 min of capacitation, 2  $\mu$ M P4 was introduced in the capacitating medium (time 0) and the % of AR was followed during 30 min at 2 concentrations of sperm:  $10^6$  sperm /ml (black squares) or  $10^4$  sperm / ml (red circles). (E). Similar experiments performed with 10  $\mu$ M P4.

**Fig. 9. Successive activation of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and mGX sPLA<sub>2</sub> during P4-induced AR.** (A) After 35 min of capacitation, 2  $\mu$ M P4 was introduced in the capacitating medium (time 0) and the % of AR was followed during 30 min. AR rate was expressed at the % of sperm achieving AR during the P4 period only. BEL (10  $\mu$ M) and LY329722 (LY, 1  $\mu$ M) were introduced at the beginning of the capacitation period. Two conditions were compared: BEL only (red triangles, n=3) or BEL + LY (green squares, n=3). Black squares correspond to the kinetic of P4-induced AR of WT sperm measured in control condition, without PLA<sub>2</sub> inhibitor (n=12) (B) Similar experiments performed with 10  $\mu$ M P4.

**Fig. 10. Kinetic study of acrosome reaction reveals successive calcium mobilization pathways at different P4 concentration.** (A,B) After 35 min of capacitation in M16-2% BSA medium, sperm were transferred in M16-2% BSA medium containing either U73122, an inhibitor of PLC (green triangles) or without added  $\text{Ca}^{2+}$  (Blue diamonds) or without added  $\text{Ca}^{2+}$  + U73122 (purple squares). Two or 10  $\mu$ M P4 was then introduced in the capacitating

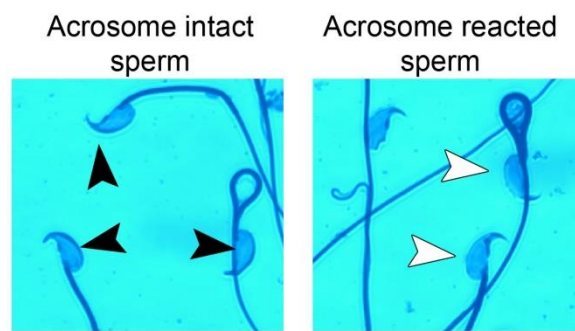
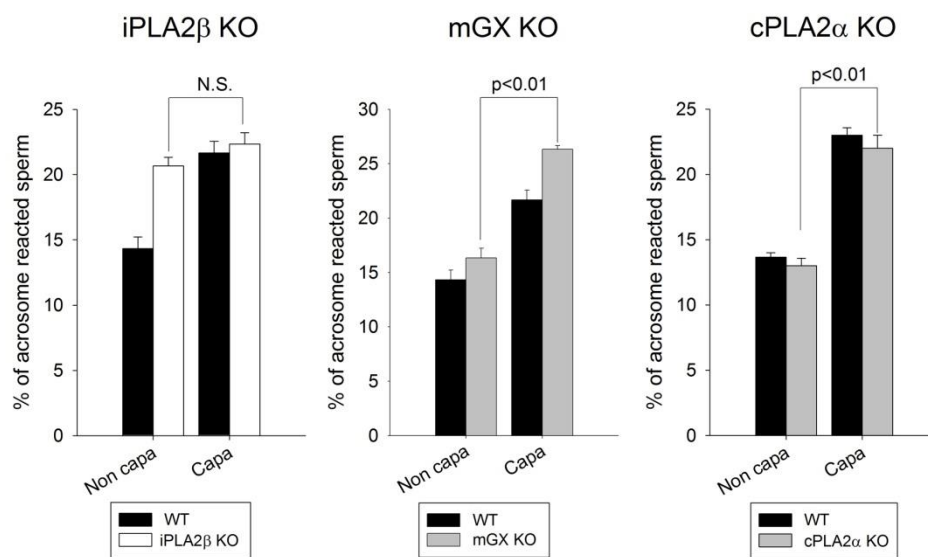
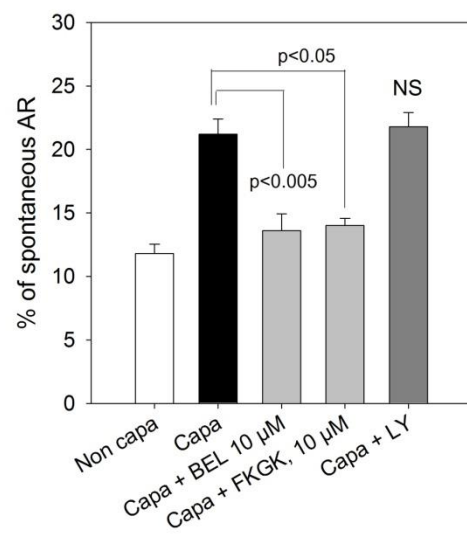
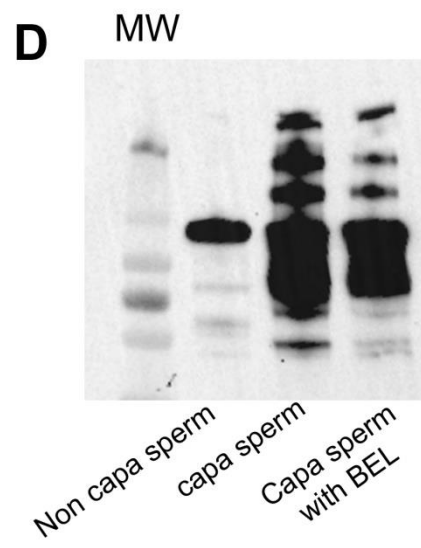
medium (time 0) and the % of AR was followed during 30 min. AR rate was expressed at the % of sperm achieving AR during the P4 period only. Black squares correspond to the kinetic of P4-induced AR of WT sperm measured in control condition.

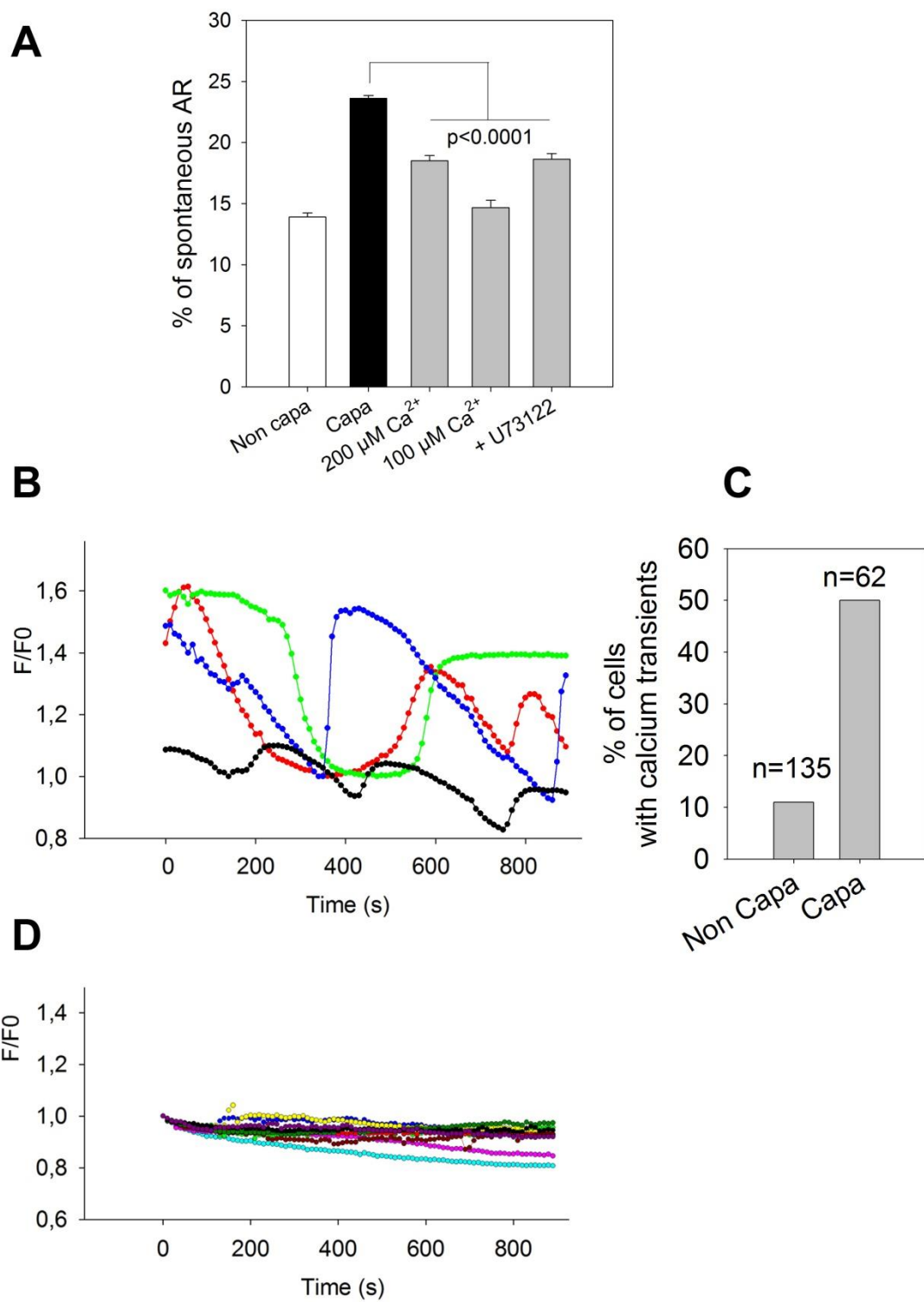
**Supplementary Fig. 1. Effect of PLC inhibition or lowering external  $\text{Ca}^{2+}$  on the appearance of tyrosine phosphorylation of sperm proteins during capacitation.** Sperm were incubated during 65 min in a capacitation medium (M16-2% BSA) at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  containing the PLC inhibitor **U73122** or different free  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Then the whole sperm extract was subjected to Western blotting by the procedures outlined in Materials and Methods.

**Supplementary Fig. 2. Pyr-1 does not inhibit AR in sperm from iPLA $_2\beta$  KO males.** Mouse sperm were capacitated during 35 min and AR triggered with 2 or 10  $\mu\text{M}$  P4 during 30 min, and the % of acrosome reacted sperm was measured in sperm from WT and iPLA $_2\beta$  KO males in absence or in presence of Pyr-1 (n=3)

**Supplementary Fig.3. Kinetics of AR in iPLA $_2\beta$  KO mice.** AR was triggered either by 2  $\mu\text{M}$  (A, blue triangles, n=3) or by 10  $\mu\text{M}$  P4 (B, blue triangles, n=3). Kinetic of sperm from WT males are plotted on the same graph (black circles, n=12)

**Supplementary Fig. 4. The Catsper channel inhibitor NCC (2  $\mu\text{M}$ ) does not inhibit P4-induced AR.** Mouse sperm were capacitated during 35 min and AR triggered with 2 or 10  $\mu\text{M}$  P4 during 30 min, and the % of acrosome reacted sperm was measured in sperm from WT males in absence or in presence of NCC (n=3).

**A****B****C****D****Figure 1**



**Figure 2**

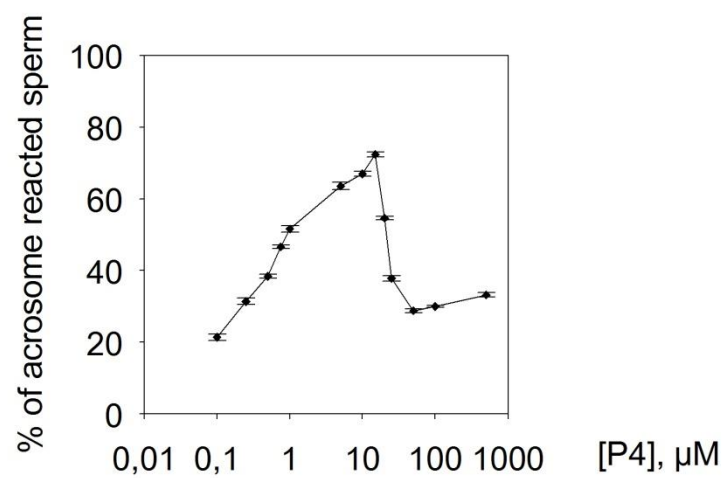
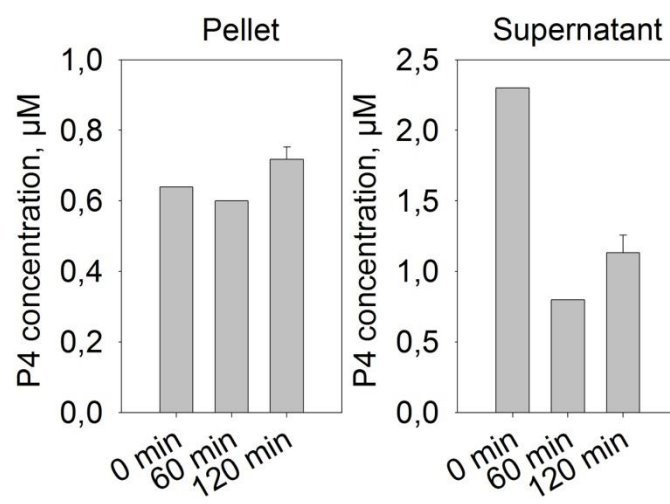
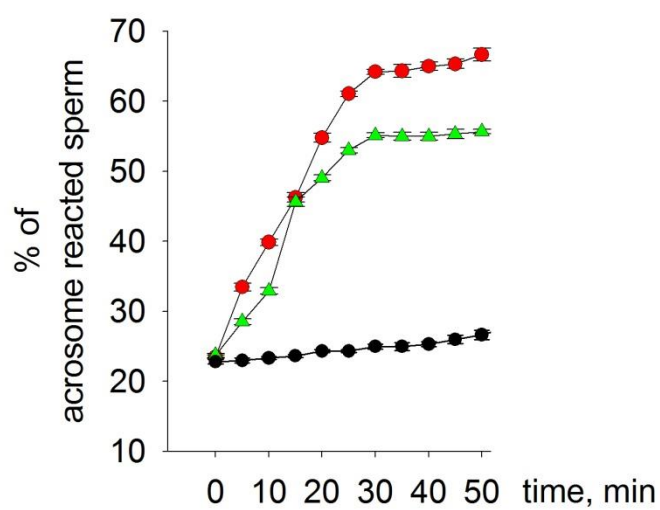
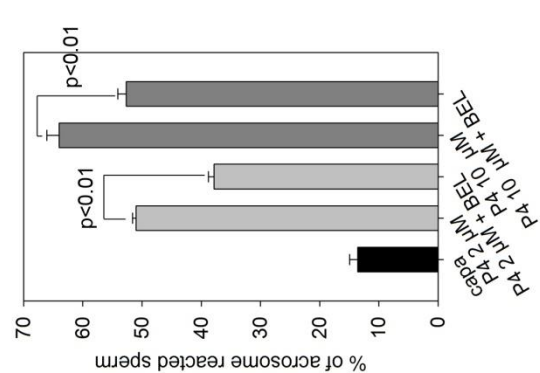
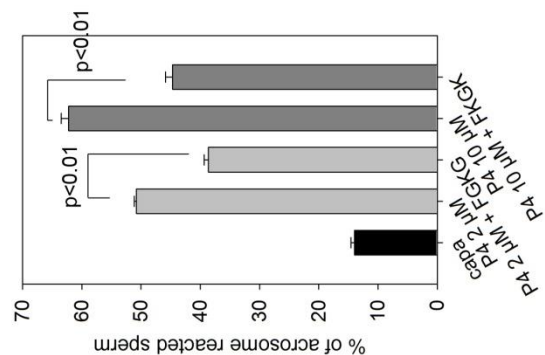
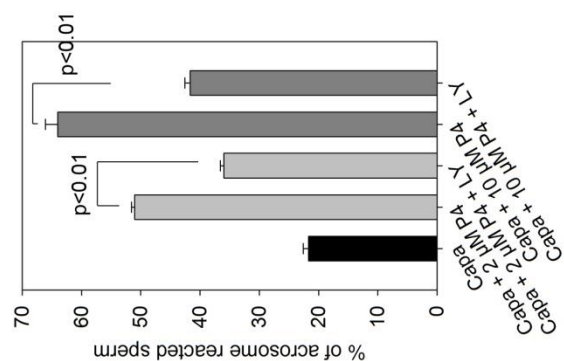
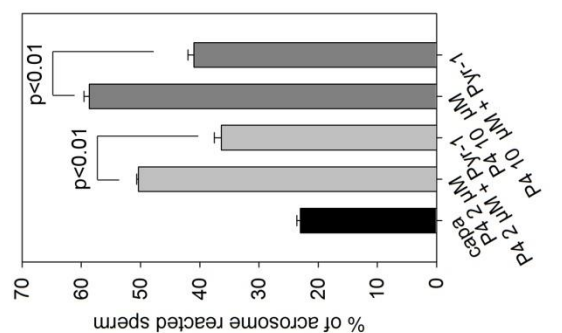
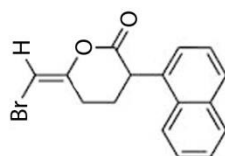
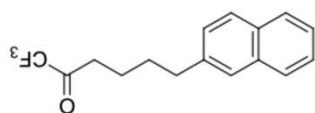
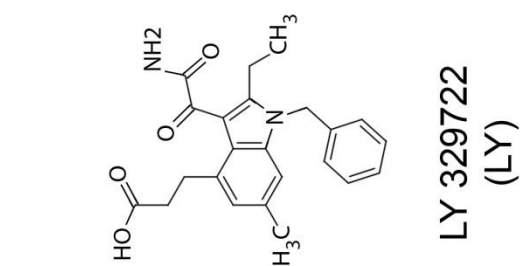
**A****B****C**

Figure 3



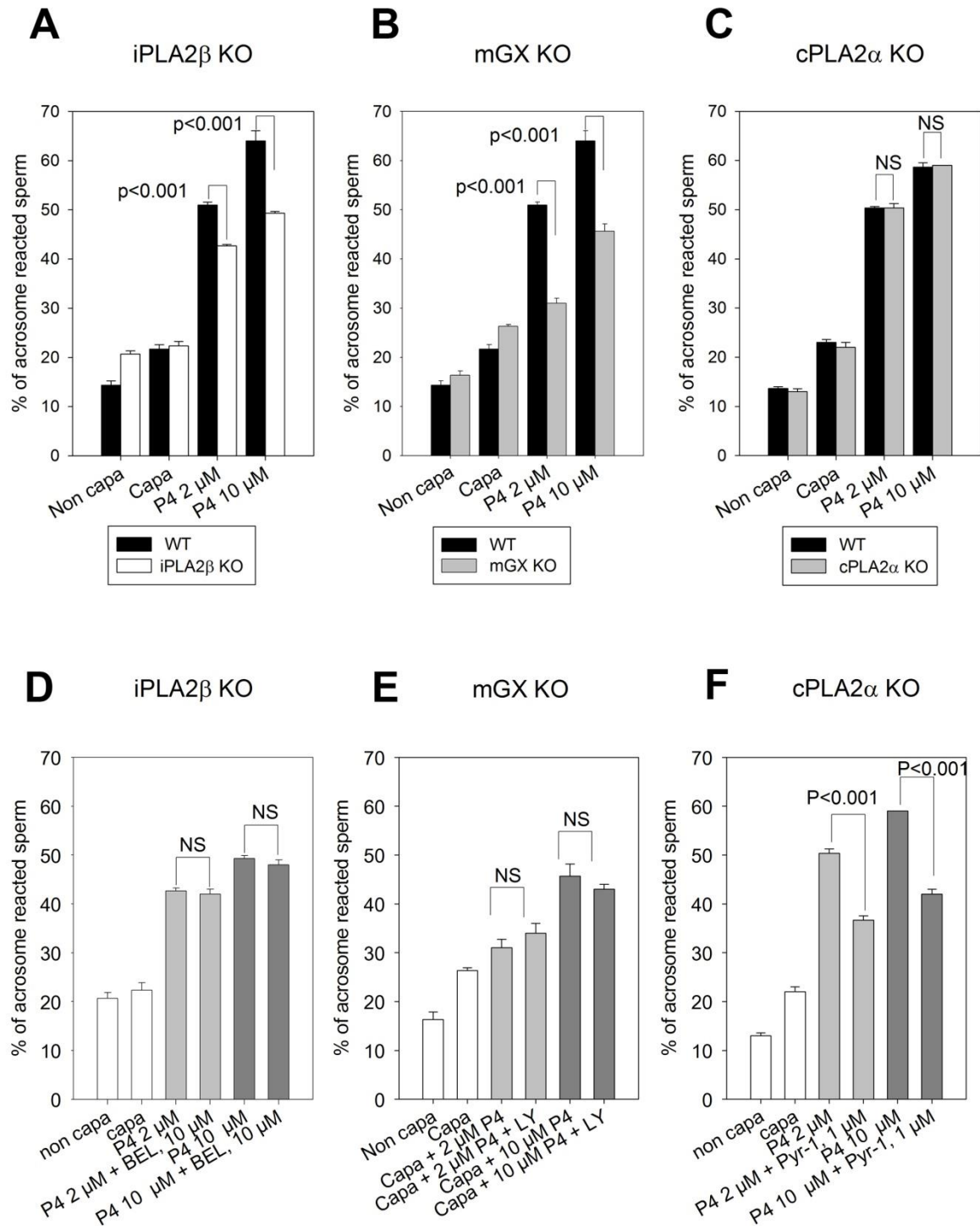
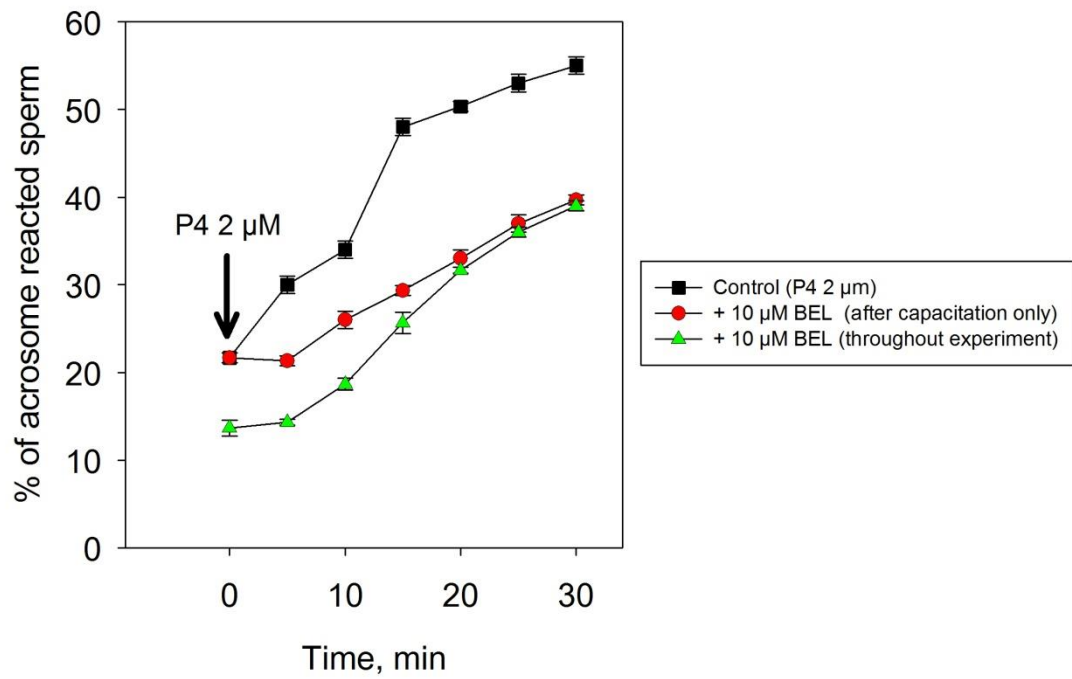
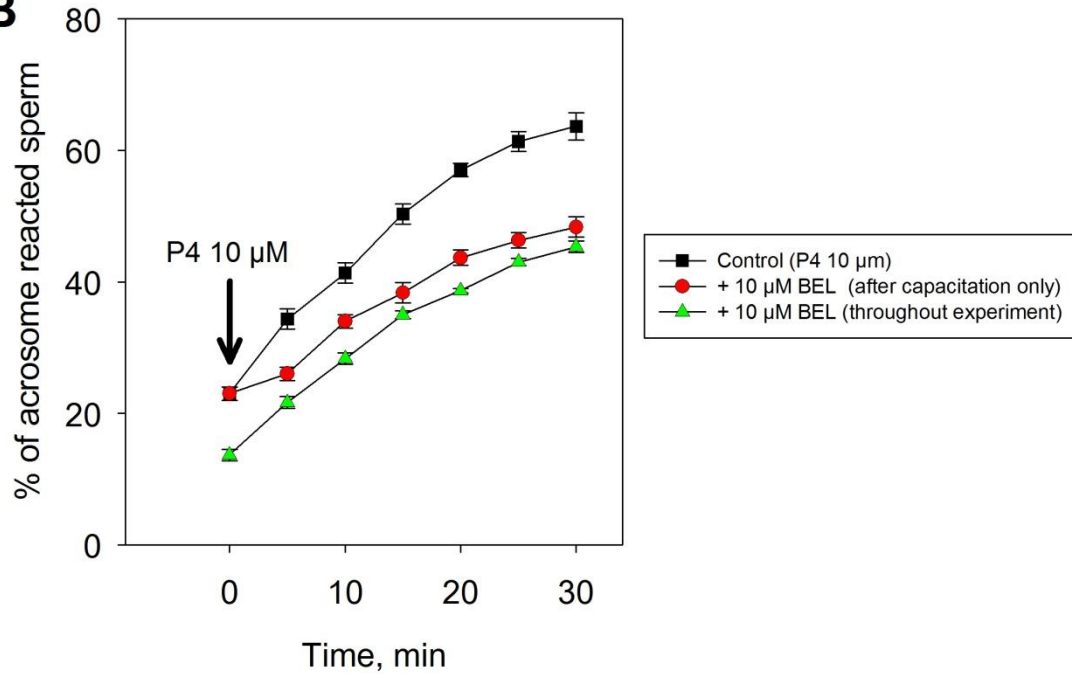
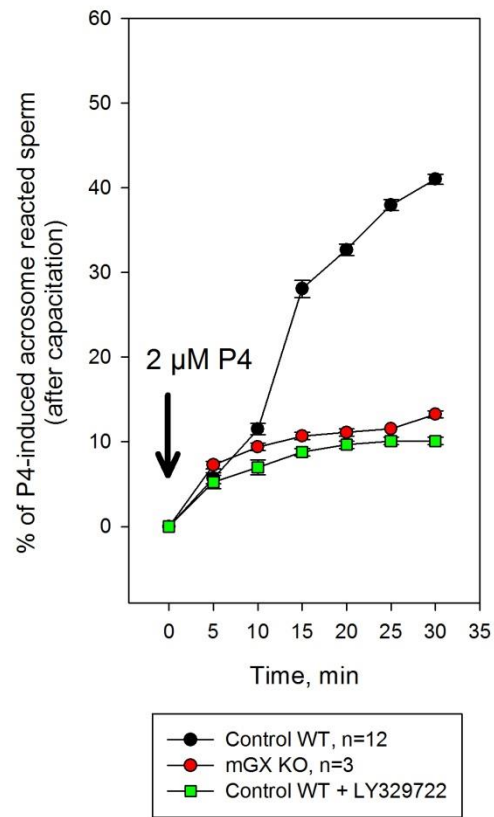
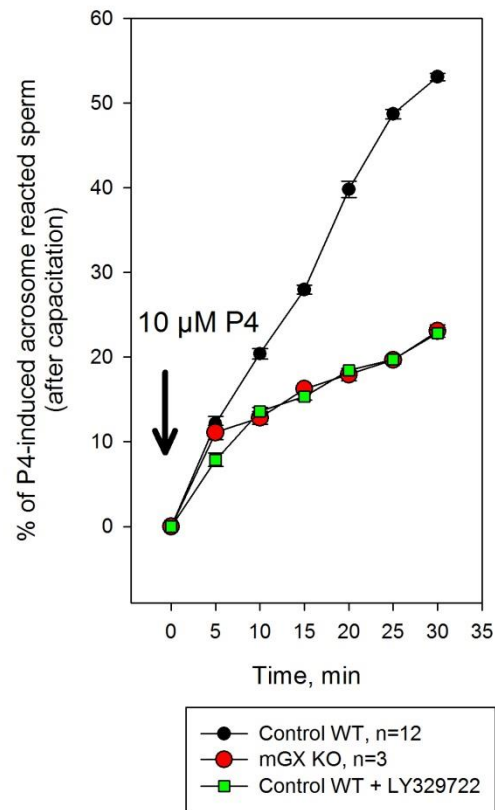
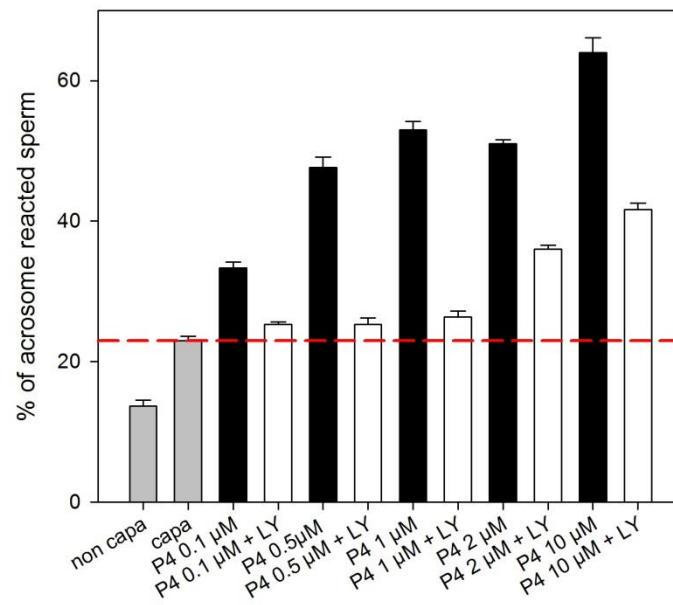
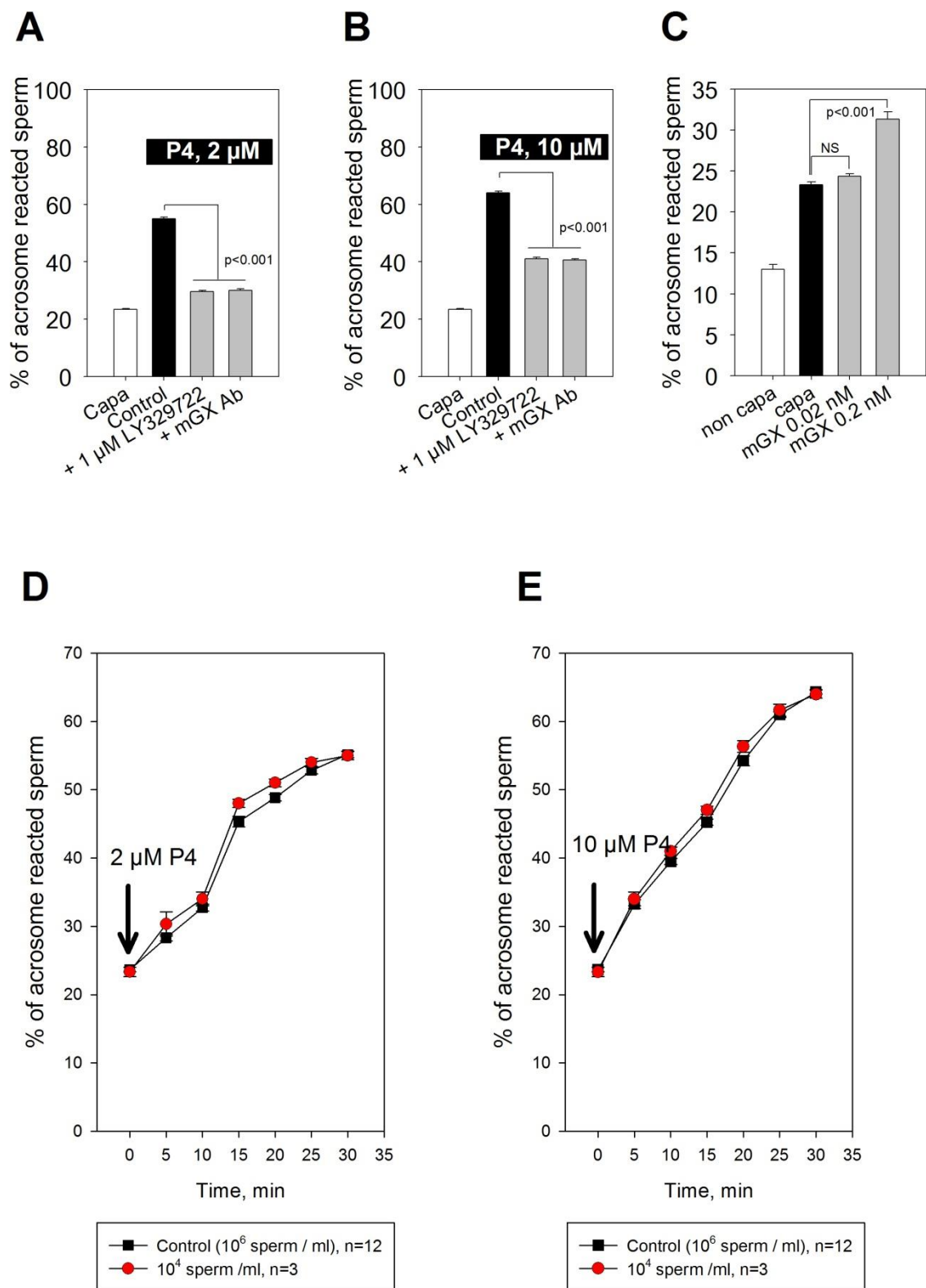


Figure 5

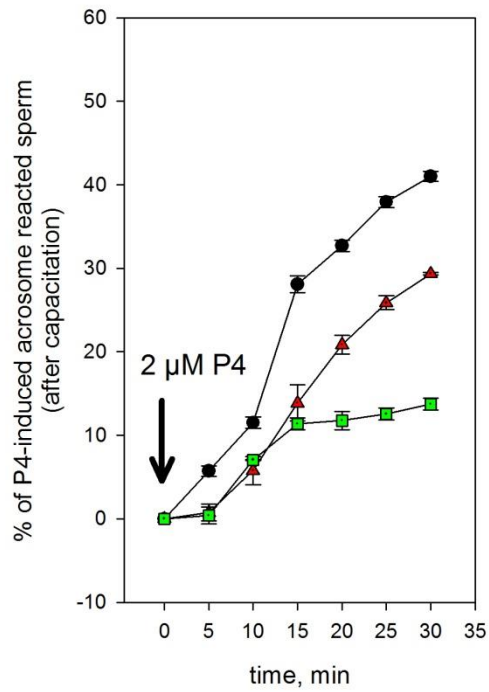
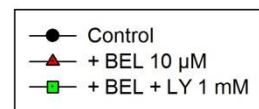
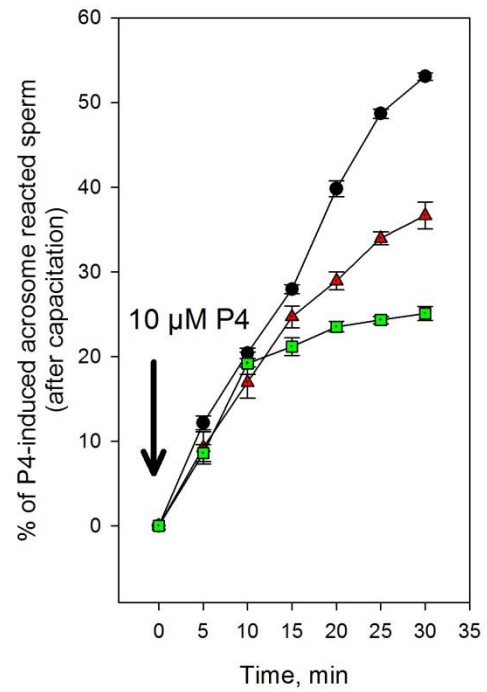


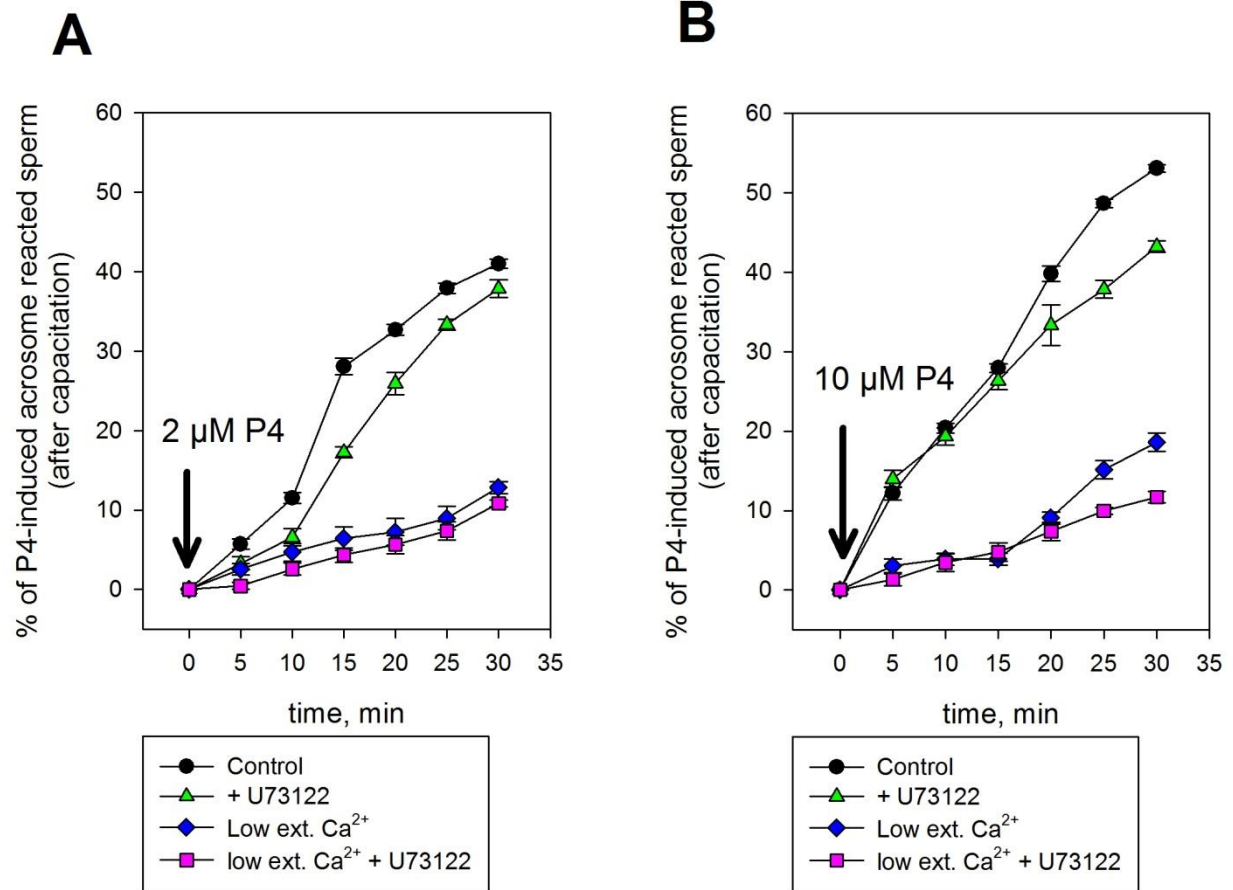
**A****B****Figure 6**

**A****B****C****Figure 7**

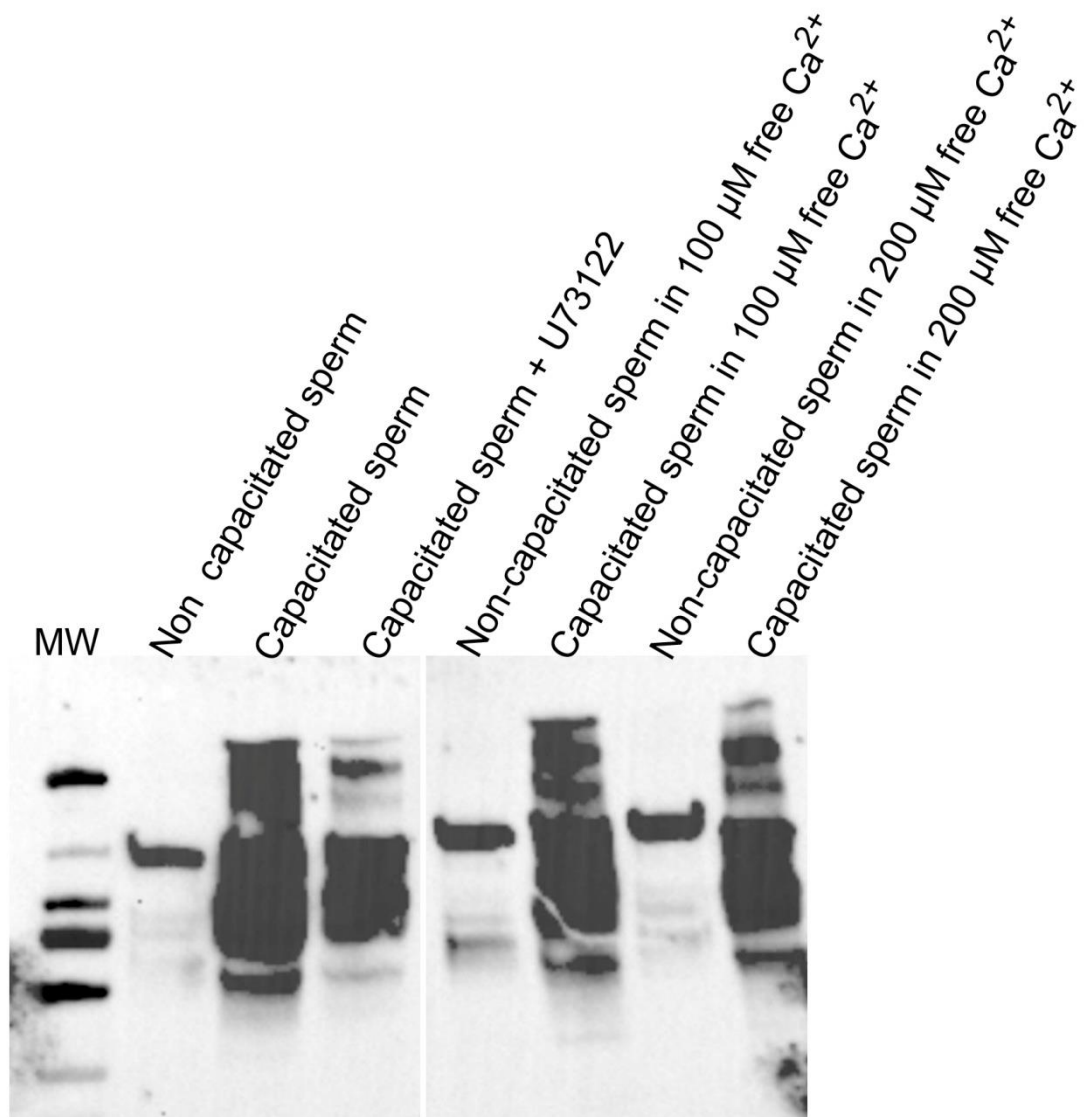


**Figure 8**

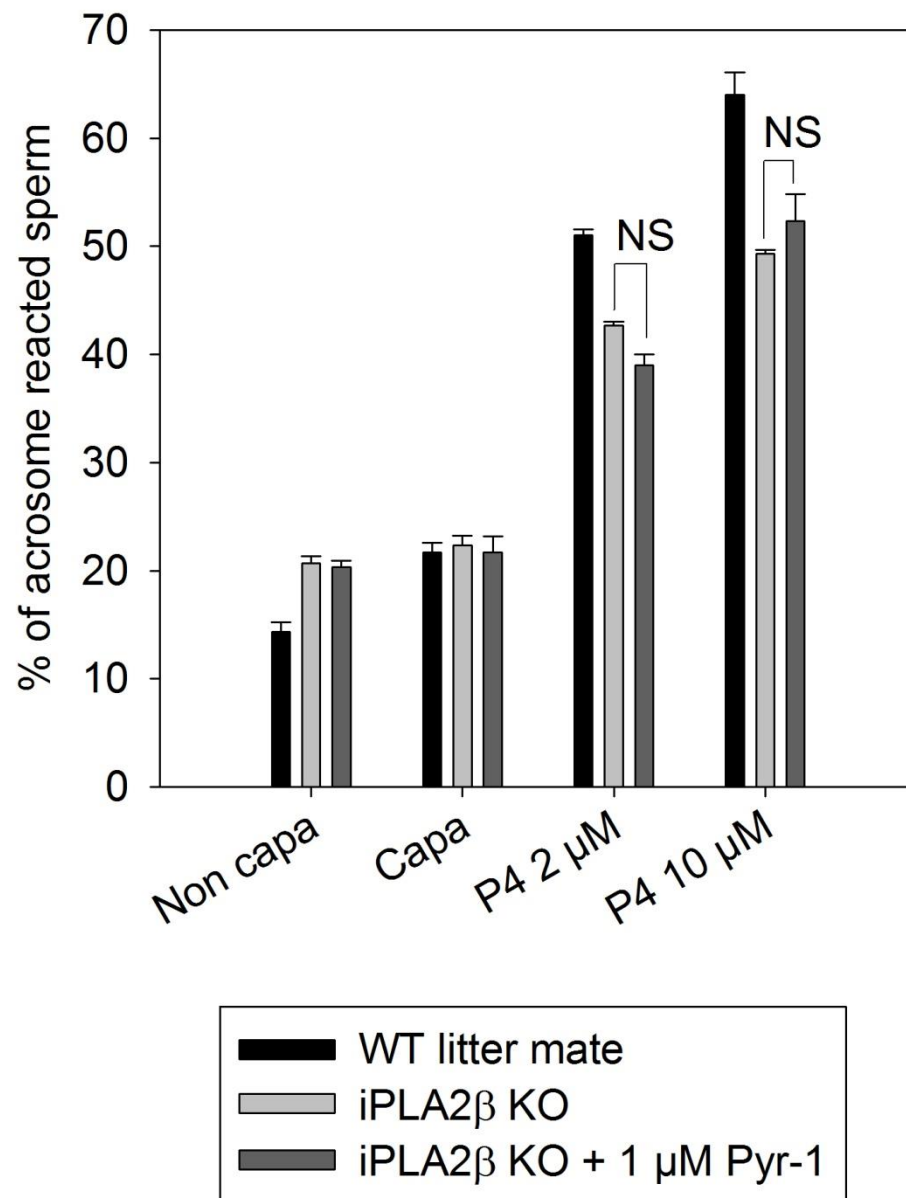
**A****B****Figure 9**



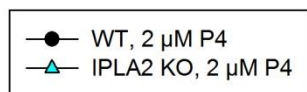
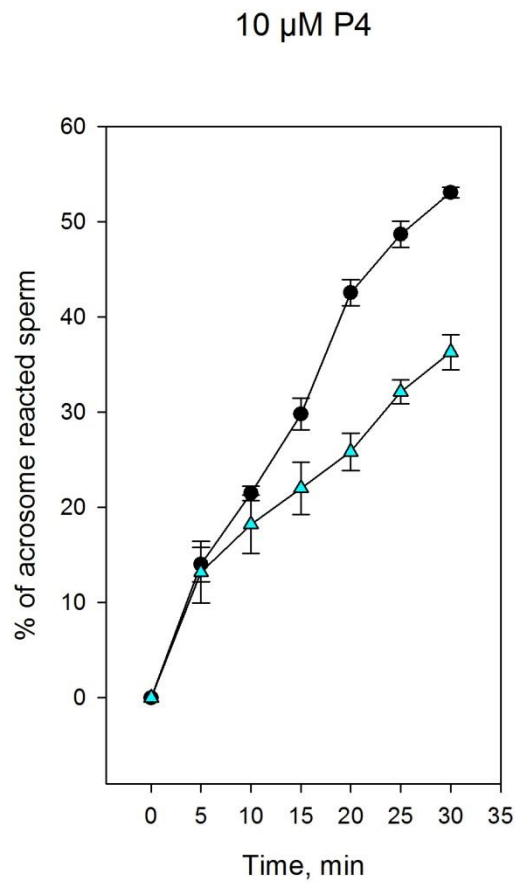
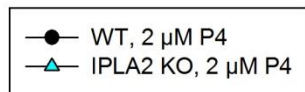
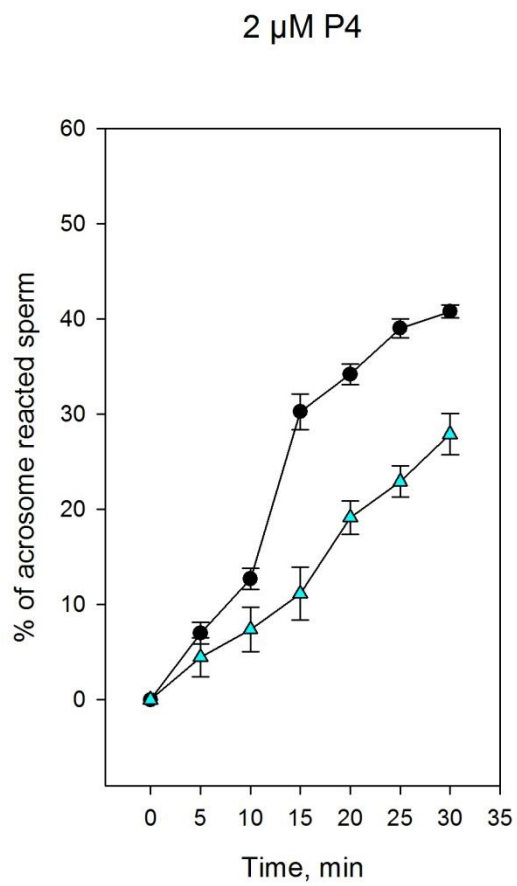
**Figure 10**



**Supplementary Figure 1**

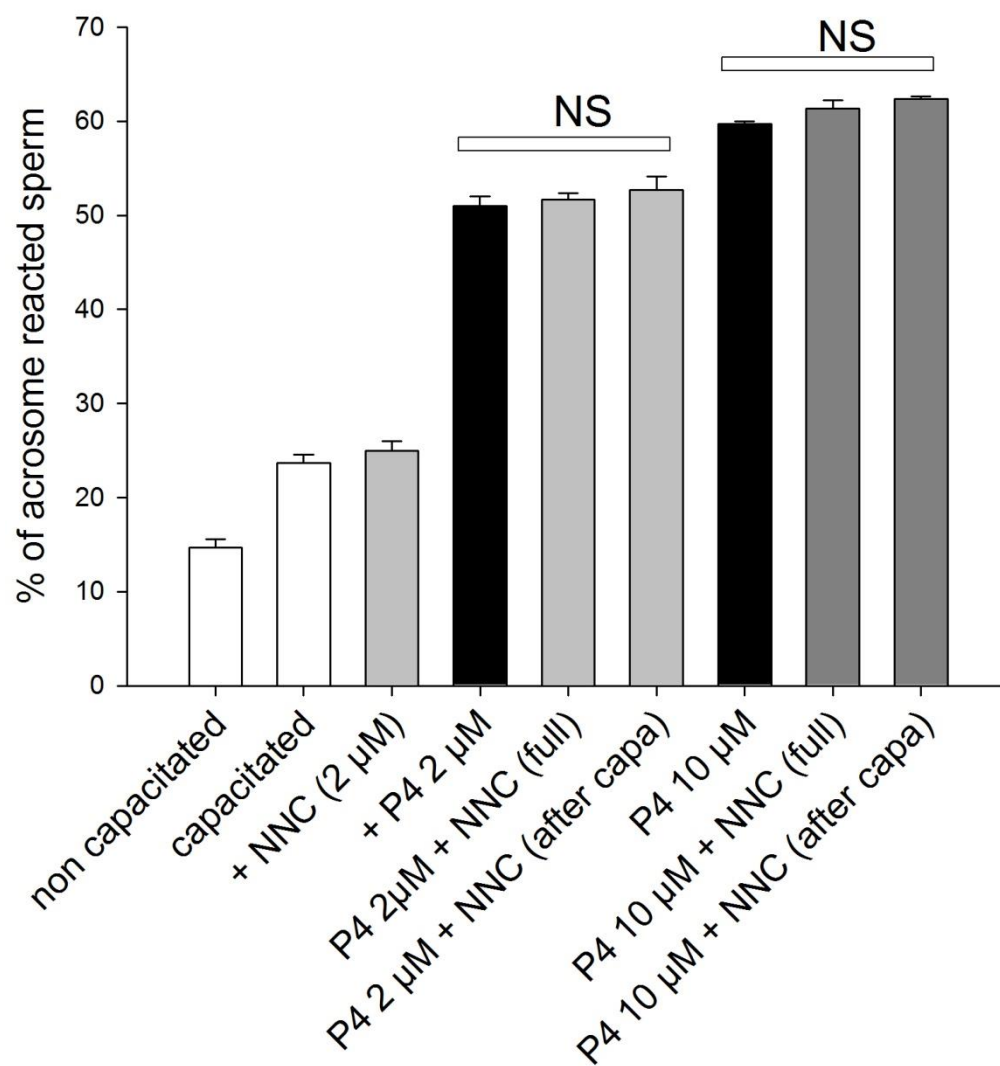


Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3





Supplementary figure 4



## ***Résultats en voie de soumission pour publication:***

**L'effet de mGX sur la fécondation passe par 2 mécanismes différents : Par son activité enzymatique et par son interaction avec son récepteur (PLA2R1) qui est souche dépendant.**

### **Objectif du travail :**

J'ai testé différents isoformes de sPLA2 murines sur la RA et leurs effets n'étaient pas comparables, la mGX se présentant comme l'isoforme la plus efficace (Abi Nahed et al 2014). On peut proposer deux explications au fait que l'effet de la sPLA2 varie suivant l'isoforme. La première hypothèse est que l'activité catalytique est différente suivant l'isoforme. Cette hypothèse s'appuie sur la grande diversité des glycérophospholipides. En effet, on ne peut pas exclure que la mGX présente une affinité accrue pour un type particulier de phospholipides. L'hydrolyse de ces phospholipides particuliers serait alors plus favorable à la RA que l'hydrolyse des autres phospholipides. La seconde hypothèse est que le mécanisme de la sPLA2-X est mixte. Son action est alors liée d'une part à son action enzymatique propre, et d'autre part à une certaine spécificité de cette sPLA2, avec une interaction de type ligand-récepteur.

Dans le chapitre des phospholipase A2 (chapitre 6) j'ai développé une partie sur les 2 types de récepteurs aux PLA2, qui sont présents à ce jour chez la souris. Dans ce travail je suis intéressé de voir si l'activité des PLA2 plus précisément des sPL2 (mGX) passe par le récepteur de type M. Le récepteur PLA2R1 (initialement appelé récepteur de type M) est découvert en 1990 à l'aide d'une phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) de venin de serpent appelée OS2. Cette dernière se lie à PLA2R1 avec une très haute affinité de 7 pM. Chez la souris, est montré que sept de ces douze sPLA2 se lient à PLA2R1.

On suppose alors pour la première fois, la présence, sur les spermatozoïdes et ou sur les ovocytes, d'un récepteur spécifique à la mGX. Pour vérifier cette hypothèse j'ai utilisé la molécule mGX H48Q, qui a une structure très proche de mGX mais sans son activité enzymatique et aussi j'ai utilisé des souris qui n'expriment pas le récepteur PLA2R1.

## **Matériel et méthodes :**

### **Modèle d'étude :**

Des souris de la lignée OF1 (Oncins France 1) Wt (wild type), fertiles, non consanguines, et des souris C57bl6/j (souris consanguines) obtenus de « Charles River Laboratories » ont été utilisées pour les expérimentations. Des souris mGX KO et PLA2R1 KO ont aussi été utilisées dans cette étude. La manipulation de ces souris a été réalisée en conformité avec les réglementations sur l'expérimentation animale.

### **Fécondation in vitro:**

Les souris femelles OF1 sont traitées par l'hormone PMSG pour stimuler et synchroniser la maturation des ovocytes (voie intra péritonéale, 5 UI/souris). 48h plus tard, 5 UI/souris d'hormone hCG est injectée par voie intra péritonéale pour achever la maturation ovocytaire (passage de la prophase I en métaphase II) et déclencher l'ovulation. 12h plus tard, les femelles sont sacrifiées par dislocation cervicale et les ovocytes avec leur cumulus sont récupérés en amas dans l'ampoule tubaire et incubés dans du milieu M16 à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Préparation des spermatozoïdes :**

La souris mâle est sacrifiée. Les spermatozoïdes, obtenus par dilacération de la queue de l'épididyme, sont récupérés dans 1ml de milieu M2 et incubés pendant 10 min à 37°C, pour assurer leur dispersion homogène dans le milieu (sperm swimming). La suspension cellulaire est ensuite aliquotée en tubes de 100 µl, auxquels nous ajoutons 400 µl du milieu M16-2% BSA (Bovine Serum Albumin) (20mg/ml). Une capacitation des spermatozoïdes durant 55 minutes à 37°C-5% CO<sub>2</sub> est réalisée. Selon les conditions testées dans la suite de ce manuscrit, 2, 20 et 200 nM de mGX ou mGX H48Q sont ajoutés dans les 10 dernières minutes de la capacitation. Après capacitation, le contenu des tubes est centrifugé à 500G pendant 5 minutes. Le culot est repris dans 500 µl M16 sans BSA. Les spermatozoïdes sont séparés en 2 lots : le premier lot pour la fécondation et l'autre pour la réaction acrosomique.

### **Fécondation :**

Les spermatozoïdes capacités selon les différentes conditions, décrites ci-dessous, sont incubés à une concentration de l'ordre de 1.5 à 5x10<sup>5</sup> cellules/ml avec les ovocytes dans le milieu M16 (37°C-5% CO<sub>2</sub>) pendant 4 heures. Après 4h de co-incubation des gamètes, les ovocytes sont transférés dans 1ml de M16 propre, ce qui permet d'éviter la polyspermie. Le taux de fécondation est calculé 24h après ce lavage.

### **Comptage des ovocytes :**

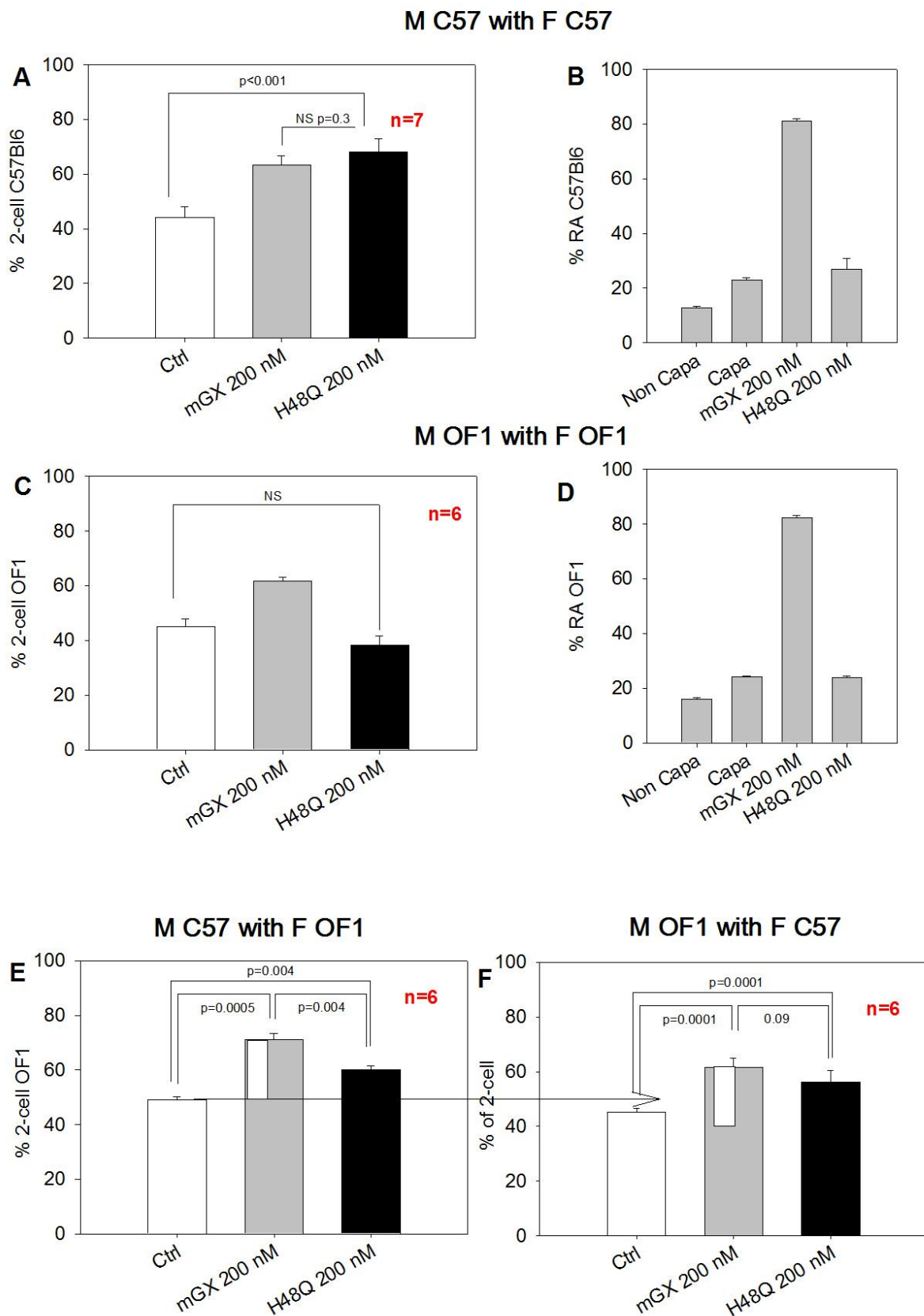
L'analyse des taux de clivage ovocytaires est faite au microscope inversé à contraste de phase (Leitz Wetzlar Microscope). Seuls les ovocytes arrivant au stade de deux cellules (stade 2)

sont considérés comme clivés. En revanche, les ovocytes fragmentés, lysés et au stade de deux globules polaires (GP2) sont éliminés.

#### **Détection de la réaction acrosomique des spermatozoïdes murins :**

Les spermatozoïdes capacités et traités selon les conditions décrites sont lavés 2 fois en PBS (1X). Après ils sont fixés en PFA 4% et centrifugés pendant 5'-500G. Ensuite, le culot est repris dans 500 µl d'acétate d'ammonium et centrifugé pendant 5'-500G. Enfin, les spermatozoïdes sont déposés sur lame polysine. Les lames réhydratés sont colorées en bleu de Coomassie 0.22 % pendant 2 minutes et rincés dans l'eau déionisée. Le bleu de Coomassie colore les protéines de la cellule, ce qui nous permettra d'apprécier la présence ou non de l'acrosome particulièrement riche en protéines. Le statut acrosomal de 100-200 spermatozoïdes est évalué pour chaque condition en microscopie à l'objectif 100X-immersion d'huile.

#### **Résultats et discussions:**



**Figure1** : Le taux de fécondation en FIV (A, C, E et F) et le taux de RA (B et D) dans différentes lignées murines pour lesquelles la RA et la FIV ont été réalisées en présence de PLA2 active et enzymatiquement inactive, H48Q.

### **L'action de mGX passe par son activité enzymatique et ou son interaction ligand récepteur.**

La figure 1 A nous montre que l'incubation des spermatozoïdes murins de souris C57bl6/j (C57) avec mGX et mGX H48Q (enzymatiquement inactive) à 200 nM préalablement à la FIV permet d'obtenir une augmentation significative de 20% du taux de fécondation chez les souris C57bl6/j par rapport au contrôle. Dans la figure 1B, seule mGX a un effet amplificateur sur la RA tandis que mGX H48Q n'a aucun effet sur la RA de souris C57bl6/j.

La figure 1 C nous montre que si on utilise des souris mâles et femelles OF1 (souris non consanguine) pour tester mGX active et mutée à 200 nM on voit une augmentation de 20 % du taux de clivage avec mGX (résultat similaire à celui obtenu avec les souris C57bl6/j. Cependant, l'utilisation de la forme mutée H48Q de mGX n'a pas d'effet sur le taux de clivage embryonnaire par rapport au contrôle. Enfin, la figure 1Dmcomme pour les souris C57bl6/j un effet inducteur de mGX sur la réaction acrosomique et l'absence d'effet de mGX H48Q dans le cas des souris OF1.

La figure 1 E nous montre que si on fait une fécondation in vitro croisée (un male C57bl6/j avec une femelle OF1) pour tester ces 2 molécules à 200 nM, mGX augmente le taux de clivage embryonnaire d'une façon significative ( $p=0.0005$ ) par rapport au contrôle, tandis que mGX H48Q n'entraîne pas de variation significative du taux de clivage embryonnaire par rapport au contrôle.

Finalement si on fait un autre croisement croisé avec un male OF1 avec une femelle C57bl6/J pour tester ces molécules à 200 nM figure 1 F on remarque que mGX et mGX H48Q augmentent le taux de clivage embryonnaire d'une façon significative par rapport au contrôle.

D'après la fig. 1 on peut dire que mGX joue un rôle important dans la RA et la fécondation ce qui est déjà démontré par Abi Nahed et al, Escoffier et al, ce rôle passe probablement par 2 mécanismes différents :

Sur les différentes FIV réalisées dans la figure 1 (fig. 1 A, C, D, E, F), on peut dire d'une part que mGX a un effet ligand récepteur puisque dans le graphe 1 A on a vu le même effet mGX et mGX H48Q sur la FIV, cela confirme qu'en absence de l'activité enzymatique mGX est capable d'augmenter le taux de fécondation sur les souris M et F C57bl6/j. d'autre part on ne voit pas l'effet ligand récepteur sur les souris M et F OF1,(puisque'on a seulement un effet avec mGX non mutée). Cela veut dire que mGX agit via son activité enzymatique dans le cas des souris OF1. On peut également supposer que les souris OF1 n'expriment pas le récepteur à mGX ou elles l'expriment mais d'une très faible concentration (ceci sera à vérifier par immunofluorescence, Western Blot et séquençage).

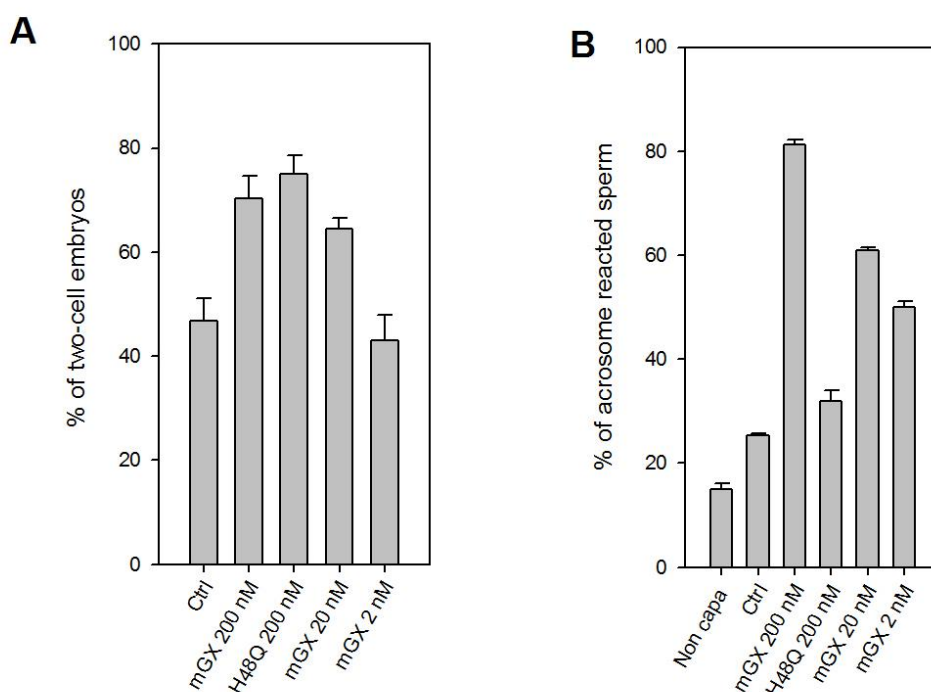
Les figures 1, E et F montrent que ce récepteur à mGX est plus probablement exprimé dans les 2 gamètes spermatozoïdes et ovocytes, tandis que si un des 2 gamètes n'expriment pas le

récepteur (le cas des croisements croisés), on voit que l'effet du ligand récepteur sera intermédiaire entre les 2 croisements C57bl6/j et OF1.

Le mécanisme d'augmentation est différent entre mGX-WT et mGX-H48Q. L'effet mGX-H48Q est en partie due à l'activation du récepteur sur les ovocytes car l'effet de mGX est perdue totalement dans le cas du mâle OF1 utilisé avec la femelle OF1, tandis qu'on n'a pas ou peu d'effet, si on utilise des femelles C57bl6. La compensation n'est pas complète avec les femelles C57bl6, ce qui montre qu'une partie passe aussi par les spermatozoïdes de souris C57bl6. Cela est confirmé par le croisement opposé, mâle C57bl6 et femelle OF1 qui montre une compensation partielle.

L'analyse des données présentées en 1B et D montre que l'induction de la RA par mGX est médiée par son activité enzymatique puisque cette induction est perdue en cas d'utilisation de mGX H48Q.

Enfin au vu des résultats différents obtenus lors des 4 types de croisements, on peut dire que l'effet ligand récepteur est souche dépendant.



**Figure 2 :** Le taux de fécondation en FIV (A) et le taux de RA (B) pour lesquelles la RA et la FIV ont été réalisées en présence de différente concentration de PLA2 active et à 200 nM de mGX- H48Q.

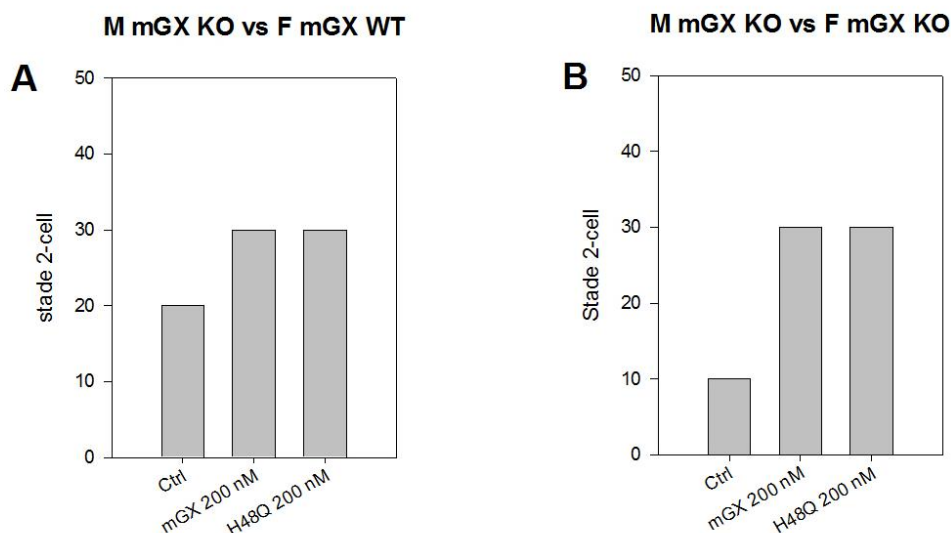


### L'activité mGX H48Q n'est pas due à l'activité enzymatique résiduelle.

L'analyse des résultats comparés entre mGX H48Q et les contrôles montre que même si on utilise la forme mutée de mGX on conserve une activité enzymatique  $< 1\%$ . Cela veut dire qu'on a 2 nM d'activité enzymatique qui persiste si on utilise 200 nM mGX H48Q. Pour préciser ce point, des FIV ont été réalisées en utilisant 2 concentrations différentes de mGX non mutée (2 nM et 20 nM), ceci pour voir si l'activité enzymatique joue un rôle sur la FIV. D'après le graphe de la figure 2 A on ne voit aucun effet sur le taux de fécondation, si on utilise mGX à 2 nM (équivalent de 2 % d'activité résiduelle pour H48Q), alors qu'à 20 nM mGX non mutée, entraîne une augmentation du taux de fécondation d'une façon significative.

En revanche d'après la fig.2B : on voit une augmentation significative du taux de RA à partir de 2 nM de mGX non mutée et que mGX H48Q n'a aucun effet sur la RA.

D'après la figure 2 : on peut confirmer que l'augmentation du taux de fécondation en utilisant mGX H48Q est due à un mécanisme ligand récepteur.



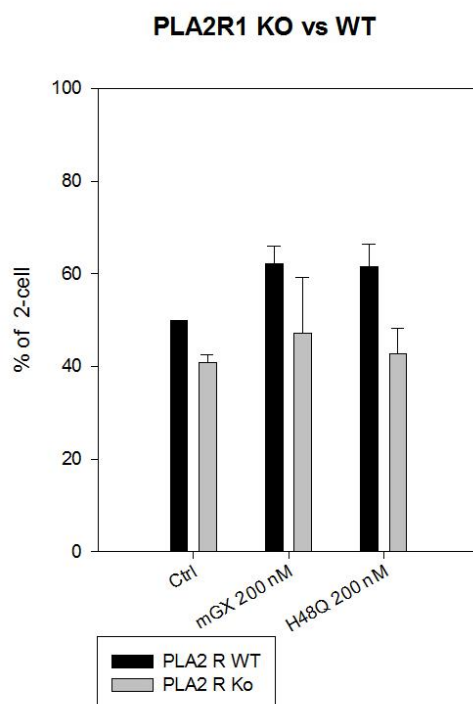
**Figure 3 :** Le taux de fécondation en FIV (A) et le taux de RA (B) dans la lignée murine mâle mGX KO avec une femelle wt pour lesquelles la RA et la FIV ont été réalisées en présence de PLA2 active et enzymatiquement inactive, H48Q

## L'augmentation du taux de fécondation dépend d'une interaction type ligand-récepteur

La figure 3A nous montre que si on fait une fécondation *in vitro* avec un mâle mGX KO (ces souris n'ont pas de mGX endogène) et une femelle WT en pré-incubant les spermatozoïdes avec mGX H48Q on a une augmentation de 10 % du taux de fécondation.

La figure 3 B montre que si on utilise pour réaliser une FIV des souris mâles et femelles mGX KO et si on incube les spermatozoïdes avec respectivement 200 nM de mGX et de mGX H48Q, on observe une augmentation de 20 % du taux de clivage embryonnaire dans les deux conditions.

D'après les résultats de la figure 3 (A et B) on peut dire que l'augmentation du taux du clivage embryonnaire est due à un effet ligand récepteur puisqu'on a eu le même taux en utilisant la molécule inactive (30 %) et la molécule non mutée (30 %).

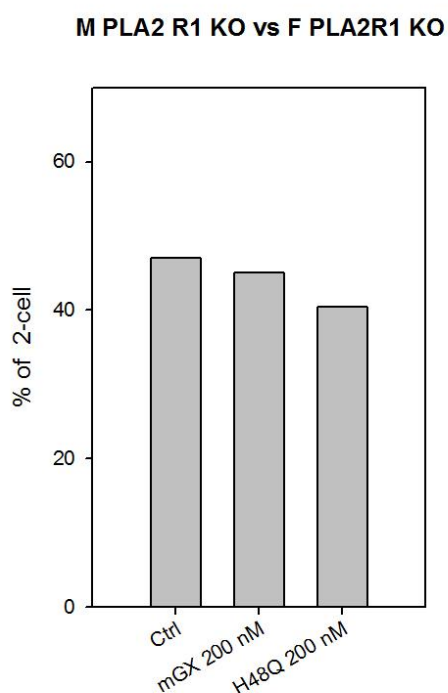


**Figure 4 :** Le taux de fécondation en FIV dans la lignée murine mâle PLA2R1 KO avec une femelle wt pour lesquelles la FIV a été réalisée en présence de PLA2 active et enzymatiquement inactive, H48Q

### **L'action de mGX passe par le récepteur PLA2R1 qui est de type M**

Pour voir si l'action de mGX passe par un récepteur on a réalisé des FIV avec des mâles PLA2R1 KO (ces souris n'ont pas le récepteur de type M) et des femelles PLA2R1 WT.

L'analyse des résultats de la figure 4 montre : dans la condition contrôle on a une diminution du taux de fécondation chez les souris mâles KO en comparant aux souris WT. On remarque aussi qu'on a perdu l'effet H48Q sur les souris KO d'une façon significative entre KO et WT, tandis qu'on a perdu un peu l'effet mGX souris PLA2R1 KO vs WT) mais d'une manière non significative. Il est donc possible de déduire que lorsque le récepteur n'est pas présent, on perd l'effet de mGX H48Q. Ceci signifie que l'action de mGX sur le taux de clivage est médiée par un récepteur.



**Figure 5 :** Le taux de fécondation en FIV dans la lignée murine mâle et femelle PLA2R1 KO pour lesquelles la FIV a été réalisée en présence de PLA2 active et enzymatiquement inactive, H48Q

### **Le récepteur PLA2R1 est situé sur les spermatozoïdes et les ovocytes**

Pour voir si le récepteur PLA2R1 est situé sur l'ovocyte, on a réalisé une FIV avec un mâle et une femelle PLA2R1 KO. On s'aperçoit que, quand le mâle et la femelle sont KO pour le récepteur PLA2R1 on perd l'effet de mGX et de mGX H48Q sur la fécondation.

Si on utilise une femelle WT on voit l'effet de mGX sur la fécondation, tandis qu'on perd cet effet de mGX quand on utilise des femelles KO. Ce qui confirme que le récepteur de mGX est situé sur les 2 gamètes : sur les spermatozoïdes et les ovocytes.

### **Conclusion Générale**

Le rôle des PLA2 groupe X sur la fécondation et la réaction acrosomique est déjà connue, dans ce projet nous montrons pour la première fois que mGX agit sur le résultat des FIV de 2 manières différentes et ces actions sont médiées par un récepteur. L'action de mGX sur la RA est en revanche liée à l'activité enzymatique de mGX.

Les propriétés de liaison des sPLA2 sur PLA2R1 restent cependant à caractériser finement dans les autres espèces de mammifères, et chez l'homme. PLA2R1 apparaît aujourd'hui comme un récepteur multifonctionnel capable d'exercer plusieurs fonctions dans l'inflammation, le cancer, la glomérulonéphrite et la maladie auto-immune il semble aussi, que ses fonctions et ses propriétés de liaison dépendent de l'espèce, et ne sont pas systématiquement conservées de la souris à l'homme et vice versa.

### **Les perspectives de cette étude :**

Pour améliorer ce travail il faut investiguer par différentes techniques comme l'immunohistochimie et le western Blot, pour voir la localisation de ce récepteur sur les gamètes.

Il faut aussi augmenter le nombre des FIV afin de comparer les chiffres par réaliser des tests statistiques.

Faire une étude plus approfondie pour voir si vraiment la lignée des souris OF1 est naturellement KO pour ce récepteur à mGX.

Si l'hypothèse de récepteur à sPLA2-X est vérifiée, H48Q sera un candidat plus spécifique que la sPLA2-X dans le traitement de l'infertilité masculine : en effet on peut penser que son innocuité sera plus importante, du fait de l'absence d'activité enzymatique.



## ***Discussion et perspectives***

### ***Les phospholipases A2 au cœur de la réaction acrosomique***

Dans les travaux présentés ci-dessus, j'ai pu montrer que la RA induite par la P4 est fortement bloquée par les inhibiteurs d'iPLA2 mais aussi par les inhibiteurs de sPLA2, démontrant ainsi l'activation de plusieurs PLA2 au cours de cette étape. De plus, des études cinétiques ont montré que leur activation étaient successives, la réaction acrosomique étant contrôlée initialement par l'activation de la iPLA2 $\beta$  et étant amplifiée ensuite par l'activation de la sPLA2 de groupe X. De plus, j'ai confirmé le rôle prépondérant du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire dans la réaction acrosomique déclenchée par la P4. Cependant les interactions entre la signalisation lipidique et la signalisation calcique sont d'une grande complexité, puisqu'elles dépendent à la fois de la concentration de P4 et du temps d'incubation. Ce travail met donc en exergue la présence de plusieurs sous-populations spermatiques présentant des voies d'activation différentes. Ce travail m'a donc permis de montrer pour la première fois, que la réaction acrosomique n'est pas un phénomène homogène et évolue en fonction du temps d'incubation de l'agoniste. Cette notion est nouvelle et représente une avancée importante dans le domaine.

### ***L'effet de la phospholipase A2 groupe X sur la fécondation est spécifique et non mimé par d'autres types de sPLA2 ni par la progestérone.***

Mes travaux ont permis de réévaluer notre compréhension du rôle des sPLA2 dans l'augmentation du nombre d'embryons lorsque les spermatozoïdes sont traités avec l'enzyme. En effet il avait postulé initialement, que le taux de réaction acrosomique était un facteur prépondérant dans le mécanisme d'action, la sPLA2 ciblant une sous population subfertile (Escoffier et al., 2010 ; Arnoult C., et al. 2012). Cependant, les nouvelles découvertes montrant que les spermatozoïdes qui n'ont pas d'acrosome sont parfaitement capables de traverser la zone pellucide (Inoue et al., 2011 ; Jin et al., 2011) ont profondément remis en question cette hypothèse. Afin d'évaluer l'hypothèse initiale, j'ai testé l'action activatrice de la P4 et de différentes sPLA2 : en comparant avec la progestérone et les autres sPLA2 testées,

il apparaît clairement qu'il n'y a pas de corrélation entre le taux de RA et l'augmentation du nombre d'embryons à 2 cellules. Ce résultat invalide donc l'hypothèse initiale qui faisait jouer à la réaction acrosomique induite par le traitement un rôle central. L'effet de la sPLA2 mGX est donc unique et ne dépend pas de la réaction acrosomique. J'ai par contre montré que l'enzyme inactive sPLA2 mGX H48Q présentait un effet comparable à l'enzyme naturelle. Ce résultat suggère que le mécanisme de la sPLA2-X est mixte : son action est liée d'une part à son action enzymatique propre, et d'autre part à une certaine spécificité de cette sPLA2, suggérant une interaction de type ligand-récepteur. La présence, sur les spermatozoïdes, d'un récepteur spécifique à la mGX reste cependant à démontrer. Sa caractérisation ainsi que de la voie de signalisation en aval ferait de mGX-H48Q un candidat plus spécifique que la sPLA2-X dans le traitement de l'infertilité masculine : en effet on peut penser que son innocuité serait plus importante, du fait de l'absence d'activité enzymatique.

### ***Composition lipidique des spermatozoïdes et rôles des métaboliques lipidiques produits par les phospholipases A2***

Certains spermatozoïdes réagissent précocement et dépendent de l'activation de la iPLA2. D'autres réagissent tardivement et dépendent de l'activation de la sPLA2. Or la iPLA2 et les sPLA2 sont connues pour avoir des spécificités de substrat importantes. Ce résultat suggère qu'il existerait plusieurs sous populations de spermatozoïdes avec des compositions lipidiques différentes et répondant à des phospholipases différentes. Il serait intéressant de séparer ces différentes sous populations et de réaliser des études lipidomiques par spectrométrie de masse afin de vérifier cette hypothèse.

De plus j'ai montré que l'action combinée de la sPLA2 recombinante et de la P4 est néfaste à la fécondation. Or mes résultats montrent que la P4 active les PLA2 endogènes. Ces données suggèrent que trop d'activité PLA2 est délétère à la physiologie spermatique. L'activité PLA2 étant responsable d'une hydrolyse lipidique, la diminution de l'efficacité de la fécondation pourrait être due à une accumulation trop importante de lipides libres (surtout des acides gras libres). Il est possible alors que ces lipides soient soumis à une oxydation rapide, entraînant un fort taux de peroxydation intracellulaire et provoquant un stress oxydatif néfaste pour la fécondation. En effet, on retrouve dans la littérature les effets nocifs de la peroxydation lipidique, notamment dans la capacité à fusionner avec l'ovocyte (Mammoto A et al.,1996). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait doser la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (essai TBARS).

### ***Utilisation des phospholipases A2 comme molécules pro-fertilité :***

Le laboratoire a découvert l'importance de la sPLA2 de groupe X dans la fécondation et a suggéré son utilisation comme molécule profertilité. Un brevet a été déposé par le laboratoire en ce sens en 2010. Cependant, avant de débiter une étude pré-clinique, il est apparu nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à leur activité. Grâce à mes travaux, nous avons approfondi les connaissances sur les mécanismes d'action des différentes PLA2 en physiologie spermatique. Notre compréhension reste cependant partielle et d'autres travaux seront nécessaires afin de pouvoir mieux anticiper les éventuels effets indésirables liés à une utilisation thérapeutique de la sPLA2 de groupe X (mGX) dans l'AMP.

Concernant le modèle murin, j'ai étudié le développement et la santé d'animaux nés à partir de spermatozoïdes traités : des embryons ont été obtenus et ont été réimplantés chez des femelles pseudo-gestantes avec succès. Quelques portées ont ainsi vu le jour et apparaissent tout à fait normales. Les animaux se sont développés à l'état adulte sans qu'aucune pathologie ne soit notée. Ces animaux ont ensuite été accouplés et plusieurs portées sont nées. Il faut cependant noter que les animaux nés grâce à l'AMP (contrôles et animaux avec spermatozoïdes traités) présentaient un surpoids notable. Ces résultats sont dans l'ensemble très rassurants.

Avant de tester l'enzyme chez l'homme, il semble important de tester son efficacité et son innocuité dans un modèle primate non humain (PNH). Des expériences de fécondation *in vitro* ont déjà commencé chez le Babouin dans le but d'étudier l'impact des spermatozoïdes traités par mGX sur leur pouvoir fécondant. En effet, si le traitement par la mGX aboutissait sur le modèle babouins aux mêmes résultats avec la naissance d'un petit parfaitement viable, alors cela permettrait de démarrer des tests cliniques sur le modèle humain.

### **Les sPLA2 jouent-elles des rôles pendant le développement embryonnaire**

Comme présenté dans l'introduction, les PLA2 interviennent dans plusieurs étapes clé de la fécondation que sont la capacitation, la réaction acrosomique et le développement embryonnaire précoce (stade deux cellules). La signalisation lipidique étant impliquée dans différents mécanismes cellulaires, je me suis intéressé à la fin de ma thèse sur une éventuelle implication de ces enzymes dans le développement embryonnaire préimplantatoire. J'ai pu



ainsi commencer des expériences pharmacologiques permettant d'évaluer leur rôle. De manière inattendue, j'ai réussi à montrer que les inhibiteurs de sPLA2 bloquaient l'éclosion du blastocyste chez la souris. Ces travaux sont en cours au laboratoire et sont maintenant déclinés sur plusieurs espèces (bovine, murine, PNH).

En conclusion, ce dernier résultat confirme que ces enzymes particulières sont fortement impliquées dans la biologie de la reproduction et de développement.

## ***ANNEXE***

### **Autres travaux auxquels j'ai participé**

# **Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and *Dpy19l2* knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment on the nuclear envelope**

Sandra Yassine<sup>1,2,#</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2,#</sup>, **Roland Abi Nahed**<sup>1,2</sup>, Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Thomas Karaouzene<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,3</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France

<sup>2</sup> Equipe "Andrologie, Génétique et Cancer" Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, La Tronche, F-38700, France

<sup>3</sup> CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

**# Shared first authorship**

**\*Corresponding author**

AGIM, Equipe " Andrologie, Génétique et Cancer "

Faculté de Médecine,

38700 La Tronche, FRANCE

Email [Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr) Phone: 33 (0)4 76 63 74 08

**Author contributions:** Sandra Yassine, Jessica Escoffier, **Roland Abi Nahed** and Virginie Pierre performed confocal and WB experiments. Thomas Karaouzene performed animal colony genotyping. Analyzed the data: Sandra Yassine, Jessica Escoffier, **Roland Abi Nahed** Pierre Ray and Christophe Arnoult. Pierre Ray and Christophe Arnoult coordinated the study. Pierre Ray and Christophe Arnoult contributed to discussion, design and interpretation of data. Christophe Arnoult wrote the manuscript.

RESEARCH ARTICLE

# Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and *Dpy19l2* Knock-Out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope

Sandra Yassine<sup>1,2‡</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2‡</sup>, Roland Abi Nahed<sup>1,2</sup>, Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Thomas Karaouzene<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,3</sup>, Christophe Arnoult<sup>1,2\*</sup>

**1** Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France, **2** Equipe "Génétique, Epigénétique et thérapies de l'infertilité" Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble, F-38000, France, **3** CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

‡ These authors are shared first authors on this work.

\* [Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Yassine S, Escoffier J, Nahed RA, Pierre V, Karaouzene T, Ray PF, et al. (2015) Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and *Dpy19l2* Knock-Out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope. PLoS ONE 10(3): e0118698. doi:10.1371/journal.pone.0118698

**Academic Editor:** Xuejiang Guo, Nanjing Medical University, CHINA

**Received:** July 15, 2014

**Accepted:** January 22, 2015

**Published:** March 16, 2015

**Copyright:** © 2015 Yassine et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The work was supported by Grant fertipla—Gravil Foundation <http://www.gravil-innovation.org/> (CA) and Grant ICG2I—Agence Nationale de la Recherche, <http://www.agence-nationale-recherche.fr> (PR;CA).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

The acrosome is an organelle that is central to sperm physiology and a defective acrosome biogenesis leads to globozoospermia, a severe male infertility. The identification of the actors involved in acrosome biogenesis is therefore particularly important to decipher the molecular pathogeny of globozoospermia. We recently showed that a defect in the *DPY19L2* gene is present in more than 70% of globozoospermic men and demonstrated that *Dpy19l2*, located in the inner nuclear membrane, is the first protein involved in the attachment of the acrosome to the nuclear envelope (NE). SUN proteins serve to link the nuclear envelope to the cytoskeleton and are therefore good candidates to participate in acrosome-nucleus attachment, potentially by interacting with *DPY19L2*. In order to characterize new actors of acrosomal attachment, we focused on Sun5 (also called Spag4l), which is highly expressed in male germ cells, and investigated its localization during spermatogenesis. Using immunohistochemistry and Western blot experiments in mice, we showed that Sun5 transits through different cellular compartments during meiosis. In pachytene spermatocytes, it is located in a membranous compartment different to the reticulum. In round spermatids, it progresses to the Golgi and the NE before to be located to the tail/head junction in epididymal sperm. Interestingly, we demonstrate that Sun5 is not, as initially reported, facing the acrosome but is in fact excluded from this zone. Moreover, we show that in *Dpy19l2* KO spermatids, upon the detachment of the acrosome, Sun5 relocates to the totality of the NE suggesting that the acrosome attachment excludes Sun5 from the NE facing the acrosome. Finally, Western-blot experiments demonstrate that Sun5 is glycosylated. Overall, our work, associated with other publications, strongly suggests that the attachment of the acrosome to the nucleus does not likely depend on the formation of SUN complexes.

## Introduction

The acrosome, is a specialized organelle allowing the sperm to cross the zona pellucida. Acrosome biogenesis is a complex event which begins with the formation of the acroplaxome, a specific cytoskeletal structure composed of a network of proteins which includes keratin 5 and beta-actin [1]. The acroplaxome binds to the nuclear envelope while specific vesicles produced by the Golgi apparatus are targeted to the acroplaxome where they fuse to generate the acrosomal vesicle. Additional vesicles then fuse with the growing acrosomal vesicle allowing its stretching during spermatid elongation. The mechanism permitting the association of the different components of the acroplaxome and their attachment to the nuclear envelope on one side and to the acrosome on the other side remain largely uncharacterized [2].

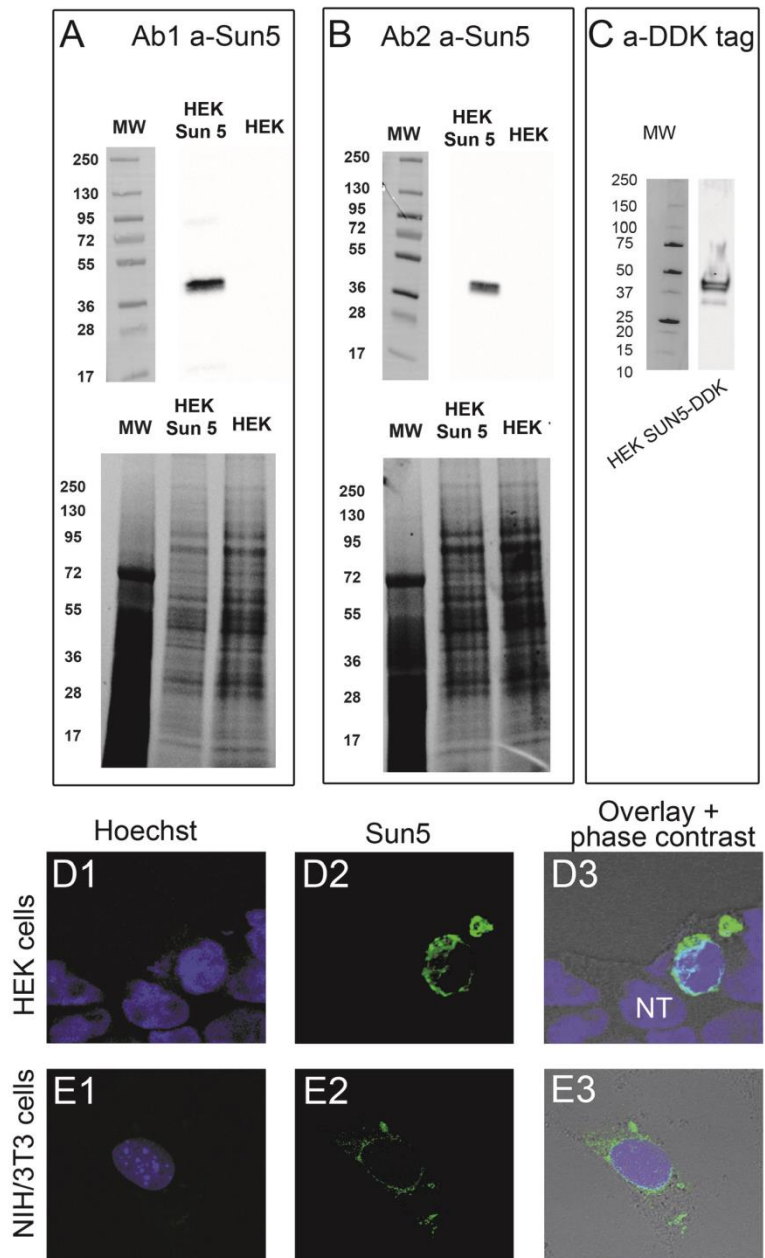
Globozoospermia is a rare genetic disorder characterized by the absence of the acrosome in sperm head. It constitutes an interesting model to study acrosome biogenesis and to identify the different molecular actors involved in sperm head formation. We recently showed that the deletion or mutations of *DPY19L2* are responsible for 70% of human type I globozoospermia [3,4] and that the corresponding protein plays a crucial role in stabilizing the attachment of the acrosome during acrosome stretching associated with spermatid elongation [5]. This result strongly suggests that other proteins are involved in the initial binding of acroplaxome on the nuclear envelope. LINC proteins (Linkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton), composed of Sun proteins on the inner nuclear membrane (INM) and Kash on the outer nuclear membrane (ONM), are particularly interesting candidates since their function is to position the nucleus within the cell via cytoskeletal interactions but also to tether centrosome and chromosomes to the nuclear envelope [6,7]. The LINC proteins located in the INM are called Sun proteins (Sad1/UNC-84 homology) and those located in the ONM, Kash proteins (Klarsicht, Anc-1, and Syne/nesprin Homology). In Mammals, there are five different Sun proteins, Sun1, Sun2, Sun3 (also called SunC1), Sun4 (also called Spag4) and Sun5 (also called Spag4l). The N-terminus of the Sun proteins is located in the nucleoplasm and interacts with different proteins of the nucleoskeleton; the C-terminus, located in the lumen of the NE, interacts with C-terminus of the Kash protein and the N-terminus of the Kash protein interacts with different proteins of the cytoskeleton. The formation of these complexes thus allows a direct mechanical coupling between proteins located inside the nucleus, such as lamins A,C (but not with lamin B) to proteins located in the cytoplasm such as actin, plectin or dyneins.

Sun1 and Sun2 are ubiquitously expressed [7]. Sun4 shows a low expression level in many tissues except in the lymph node and in the testis where it is expressed at a higher level [8]. Sun3 and Sun5 expression is restricted to the testis. All five Sun proteins are thus expressed in the testis. Interestingly, the Sun proteins present a remarkable differential localization in the spermatid. During spermiogenesis, Sun1 localization is restricted to the posterior part of the spermatid where it interacts with Syne3 Kash protein. Sun1 is however excluded from the implantation fossa, the articulation which serves to attach the neck (and the rest of the flagella) to the head. Sun3 is absent from the posterior and anterior poles of the elongating spermatid and colocalizes with the microtubules of the manchette along the lateral NE and interacts with the Syne1 Kash protein [9]. Concerning Sun4, the protein is located in the manchette area during spermiogenesis and in the flagellum in mature sperm cell [8]. Its function in NE is however not described in mammals so far. Interestingly, the ortholog of Sun4 in *Drosophila* is required for correct positioning of the centriole during spermatogenesis. This result strongly suggests a specific role of Sun4 protein during spermatogenesis [10]. Finally, Sun5 is expressed during spermiogenesis. It is described to present five alternative transcripts but their differential expression pattern has not been investigated. Contradictory results were published regarding Sun5 expression and localization. A first report has shown that Spag4l (alias of Sun5) and

Spag4l-2 (a longer isoform of the same gene) are expressed after the meiosis and are located in the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome [11] whereas a second study reported an early and strong expression during meiosis [12]. Sun5 could therefore be one of the missing link between the nuclear envelope and the acroplaxome and may, with Dpy19l2, participate to the anchoring of the acroplaxome to the NE. The characterization of these missing links is particularly important in the context of type I globozoospermia, since around 30% of cases are still unexplained. To address this question, we re-evaluated the localization of Sun5 during spermatogenesis. In this paper, we first demonstrate that Sun5 is present at the pachytene stage within the cytoplasm and migrates to the NE at the round spermatid stage. We demonstrate however that, contrary to previously published work [11], Sun5 is not located in the NE facing the acrosome. Moreover, we show that in Dpy19l2 knock-out round spermatids, the detachment of the acrosome leads to Sun5 and lamin B1 relocalization, confirming that Sun5 protein is excluded from the NE facing the acrosome. We therefore show that Sun5 cannot be a functional partner of Dpy19l2, strongly suggesting that Sun5 is not involved in acrosome attachment. In round and elongated spermatids, Sun5 presents a localization that is partly similar to Sun1 and 3. In epididymal sperm, it moves to the junction area between the tail and the sperm head. Finally, we show that Sun5 transits through the Golgi apparatus, leading to post-translational modifications, as witnessed by the appearance of a glycosidase-sensitive band in Western-blot experiments.

## Results

In order to study the potential role of Sun5 during spermatogenesis, we first characterized two different antibodies targeting different epitopes, one from a commercial company (Ab1) and one laboratory designed (Ab2). HEK cells were first transfected with the Sun5 plasmid (mouse Spag4l, short isoform). Gels of proteins, revealed separately with both antibodies, presented the same profile of bands in Western blotting experiments: two close bands were immunodecorated, with an approximate molecular weight of 40 KDa (Fig. 1AB). These two bands are also clearly evidenced with protein extracts from HEK cells, transfected with a plasmid containing the human SUN5, tagged with DDK tag and revealed with anti-DDK antibody (Fig. 1C). DDK is a low molecular weight tag (DYKDDDDK (1012 Da), known to not interfere with protein function (expected MW of Sun5-DDK is 40.5 KDa). In contrast, blots from non transfected HEK cells showed no bands (not shown), demonstrating the high specificity of these three antibodies. Both Ab1 and Ab2 antibodies were then tested in IHC experiments and signals were observed by confocal microscopy. Ab1 marked strongly the nuclear envelope in both HEK and NIH/3T3 cells transfected with Sun5 plasmid, as expected for a protein belonging to the Sun family (Fig. 1DE). We observed in NIH/3T3 cells a fluorescent signal around the nucleus but also in the cytoplasm (Fig. 1E2-E3). This latter result suggests that Sun5 may be located in the reticulum or traffic through other membrane compartments (Golgi apparatus, ERGIC, ...). Remarkably, the non transfected cells (NT) presented no fluorescence, either around the nucleus or in the cytoplasm (Fig. 1D3). We also performed IHC control experiments on non transfected HEK cells, and similarly no staining was observed (not shown). Finally, Ab2 didn't work in IHC. Altogether, these results demonstrate that our antibodies present a high specificity in WB and that Ab1 is a valuable tool to study Sun5 protein localization in spermatogenic cells by IHC. Then, we studied the expression and localization of Sun5 in different dissociated spermatogenic cells, from the pachytene stage to mature sperm cells. We first analyzed the presence of Sun5 in pachytene spermatocyte by IHC experiments: at this stage a punctiform staining was observed only within the cytoplasm (Fig. 2A, see also S2 Fig.). It is worth noting that no staining was observed in control experiments performed on different spermatogenic cells with



**Fig 1. Specificity of antibodies targeting Sun5.** (A) Western blot of protein extracts from HEK cells heterologously expressed with or without plasmid containing mouse short isoform of Sun5 and revealed with anti-Sun5 antibodies 1 (Ab1). Below, gel of protein showing that both lanes were similarly loaded. (B) Similar experiment but revealed with anti-Sun5 antibodies 2 (Ab2). (C) Western blot of protein extracts from HEK cells heterologously expressed with a plasmid containing human short isoform of SUN5-DDK tagged and



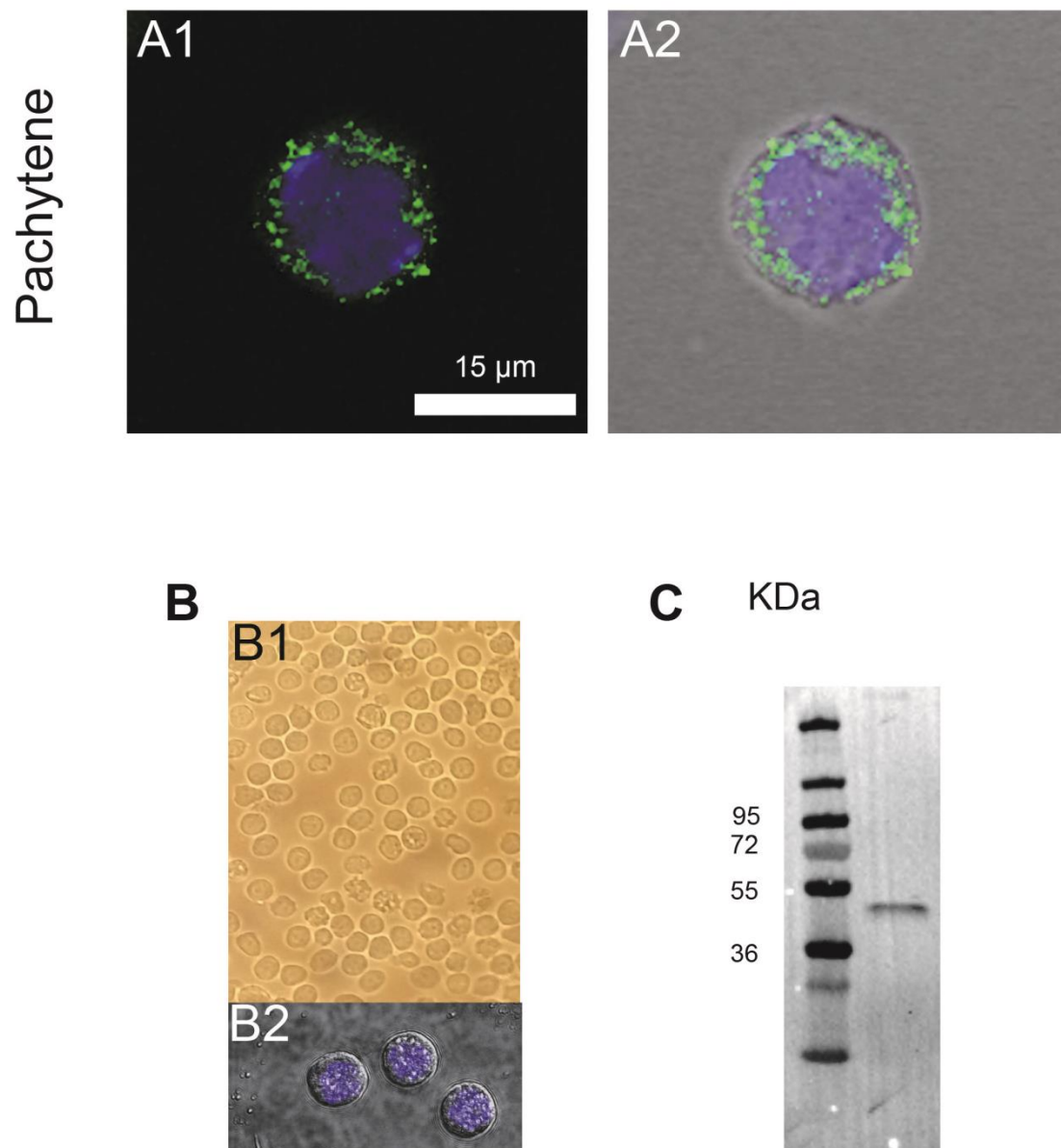
revealed with anti-DDK antibodies. **(D)** HEK cells were transfected with mouse short isoform of Sun5 and stained with Hoechst (blue, D1) and anti-Sun5 Ab1 (D2, green). D3 corresponds to overlay + phase contrast. **(E)** Similar experiment performed with NIH/3T3 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g001

only the secondary Ab ([S1 Fig.](#)). This staining is coherent with that obtained in NIH/3T3 cells and strongly suggests that Sun5 is not located in the nuclear envelope but rather within the cytoplasm at this stage. In order to validate the cytoplasmic Sun5 staining, cytoplasmic proteins extracted from dounce homogenized pachytene spermatocytes were subjected to SDS page and revealed with Sun5 Ab2 ( $n = 4$ ). Protein extracts were prepared from pachytene spermatocytes purified by unit gravity sedimentation from spermatogenic cell suspension and obtained from sexually mature males. The purity of the fraction was assessed by counting the cells exhibiting characteristic Hoechst nuclear staining under a fluorescent microscope ([Fig. 2B](#)) and we estimated that 95% of the cells were indeed pachytene spermatocytes. Ab2 immunodecorated a single band at 40 kDa, the expected MW of Sun5 ([Fig. 2C](#)). To better characterize the localization of Sun5 within the cytoplasm, a co-localization experiment of Sun5 with a reticulum marker (KDEL antibodies) was performed. Clearly, most of the Sun5 staining did not co-localize with the KDEL staining at the pachytene stage ([S2 Fig.](#)), indicating that Sun5 is located in another membranous compartment.

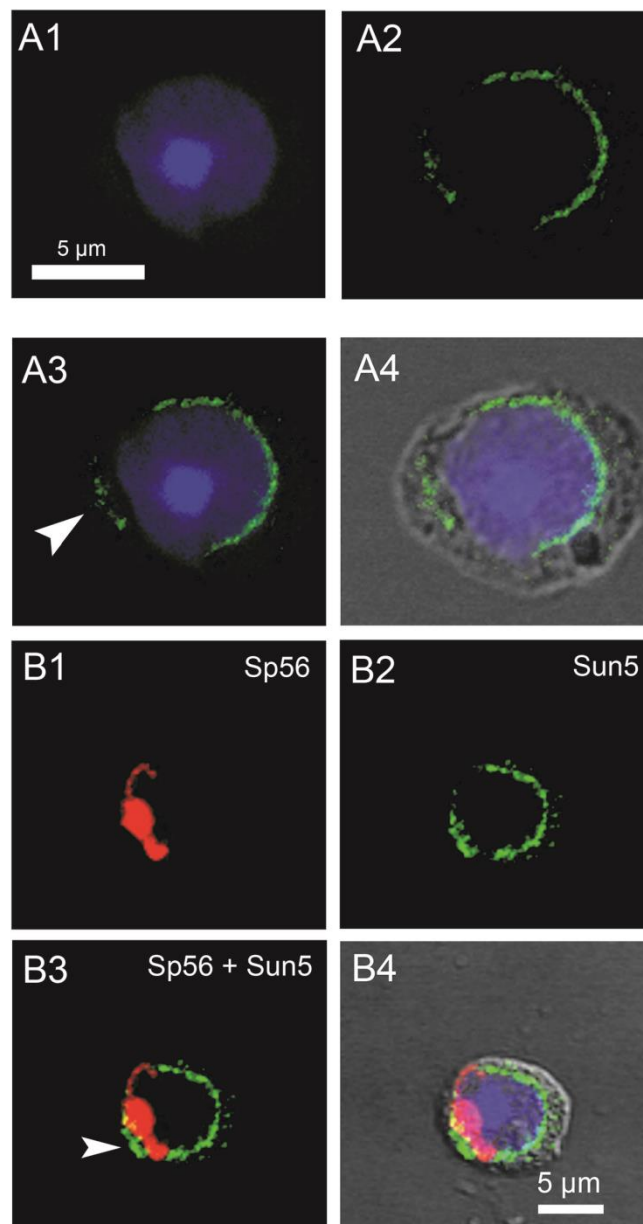
The progression of meiosis to the round spermatid stage led to an important relocation of Sun5 from the cytoplasm to the nuclear envelope ([Fig. 3A](#)), as witnessed by Sun5 staining which exhibited an incomplete ring shape at the nuclear periphery ([Fig. 3A](#)). More than 90% of round spermatids presented a discontinuous staining on the NE. In order to better characterize this incomplete ring, we performed a co-staining with anti-Sp56 antibodies, a marker of the acrosomal vesicle [13]. In fact, most of the NE facing the acrosome was not marked by anti-Sun5 antibodies ([Fig. 3B](#), see also panels A–D of [S3 Fig.](#)), and acrosome binding clearly seems to exclude Sun5 from the NE facing the acrosome. Moreover, part of the signal was not attached to the nuclear membrane and was located at a short distance from it (see head arrows, [Fig. 3A3](#)), an unexpected observation for a Sun proteins normally located in the INM [14]. In overlay with phase contrast, this signal was clearly located in the cytoplasm ([Fig. 3A4](#)). When cells were co-stained with Sun5 and Sp56 Abs, this peculiar Sun5 staining, unbound to the nuclear envelope, was always located in the vicinity of the acrosome ([Fig. 3B3](#), arrow head). Additional examples of the presence of NE-unbound Sun5 staining are showed in panels A3,B3,E3 of [S3 Fig.](#) (white and yellow arrow heads). Superimposition of Sun5 and Sp56 NE-unbound staining evidenced that Sun5 staining was always located more externally than the Sp56 acrosomal staining ([Fig. 3B3](#), white arrow head, see also panel E of [S3 Fig.](#), yellow arrow head). This remark is important because we have previously shown that the staining of Dpy19L2, a protein of the nuclear membrane involved in acrosome anchoring, was always more internally located than the staining of the acrosome in experiments performed similarly [5]. The fact that Sun5 staining is located more externally than Sp56 staining suggests that this peculiar Sun5 staining did not correspond to the NE facing the acrosome nor to the acrosome itself. This localization is compatible with the Golgi apparatus, which is located in front of the acrosome. We tested this hypothesis by performing co-staining experiments with Anti-Sun5 and anti-GM130 Abs, a marker of the Cis-Golgi. We observed a strong co-localization of GM130 and the NE-unbound Sun5 staining, demonstrating that Sun5 is targeted to the Cis-Golgi ([Fig. 4A1–4](#)). Other examples of representative co-localization of NE-unbound Sun5 staining and GM130 in round spermatids are presented in [S4 Fig.](#) This co-localization was observed in almost all round spermatids presenting a NE-unbound Sun5 staining. In the Golgi apparatus, numerous proteins are modified by the addition of carbohydrates (glycosylation) or phosphates





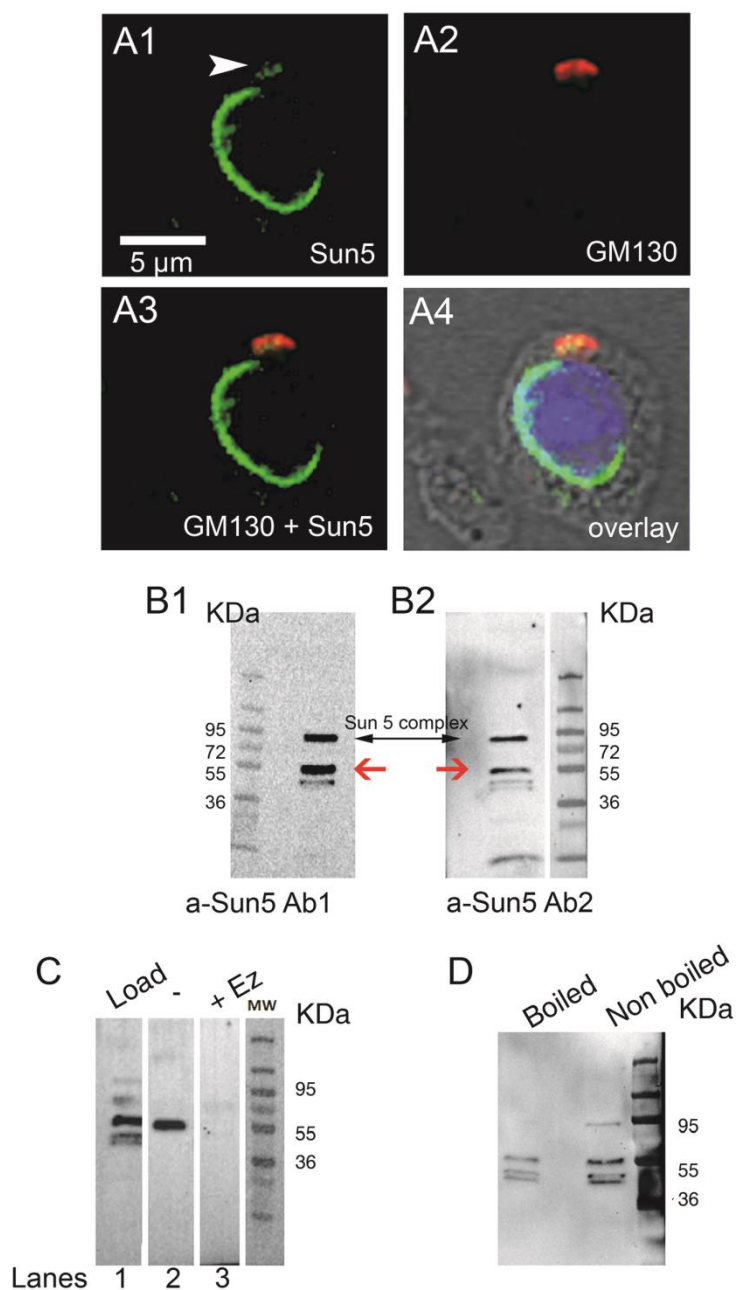
**Fig 2. Sun5 is located in the cytoplasm in pachytene spermatocyte.** (A) Pachytene spermatocyte co-stained with Hoechst (blue) and anti-Sun5 Ab1 (green) (A1). A2 corresponds to overlay + phase contrast. (B) Pachytene spermatocytes were purified by unit gravity sedimentation from spermatogenic cell suspension obtained from sexually mature males. The purity of the fraction (B1, observed with optical microscope), was assessed by counting the cells exhibiting characteristic Hoechst nuclear staining under a fluorescent microscope (B2). (C) Western blot of cytoplasmic proteins extracted from the pachytene spermatocytes showing that Anti-Sun5 Ab immunodecorates a single band around 40 KDa.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g002



**Fig 3. Sun5 is located in the nuclear envelope (NE) in round spermatid and is excluded from the NE facing the acrosome. (A)** Round spermatid stained with anti-Sun5 Ab1 (A2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (A1, blue). A3 corresponds to overlay of A1 and A2; Arrow head indicates the Sun5 staining which was not bound to the NE. A4 corresponds to overlay with phase contrast. **(B)** Round spermatid co-stained with anti-Sp56 (B1, red) and anti-Sun5 Ab1 (B2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). B3 corresponds to overlay of B1 and B2; arrow head indicates the Sun5 staining which was not bound to the NE. Note that Sun5 staining is located in a more external location than Sp56 staining. B4 corresponds to overlay with phase contrast.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g003



**Fig 4. Sun 5 progresses through the Golgi apparatus and presents post-translational modifications during spermiogenesis.** (A) Round spermatid co-stained with anti-Sun5 Ab1 (A1, green) and anti-GM130 antibodies a marker of the Cis-Golgi (A2, red) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A3 corresponds to overlay. A4 corresponds to overlay with phase contrast (B) Western blots of

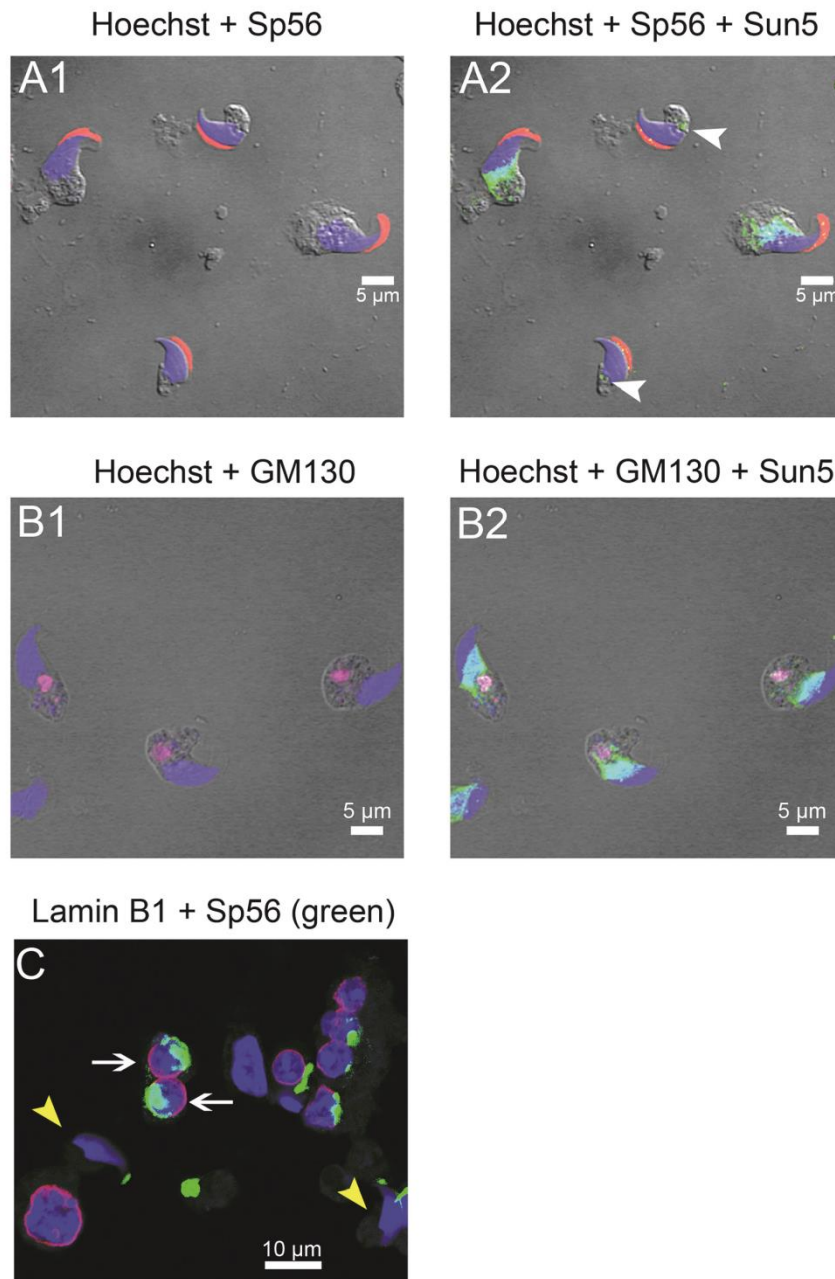
nuclear protein extracts from testis revealed with anti-Sun5 Ab1 (B1, left) and anti-Sun5 Ab2 (B2, right), showing a similar pattern evidenced by both antibodies. (C) Protein extracts (load, lane 1) were incubated 15 hours without (–, lane 2) or with a deglycosylation enzyme mix (+ Ez, lane 3) and the impact on Sun5 was studied in Western blot with Ab2 antibodies. (D) Protein extract was split in two identical fractions, and one fraction was boiled. The band at 95 KDa observed with Sun5 antibodies in Fig. 4B was no longer present when denaturation conditions were strengthened by boiling the sample in Laemmli buffer. Protein loads controlled with TGX stain free precast gels are showed in panel C of S5 Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g004

(phosphorylation). The presence of Sun5 in the Cis-Golgi therefore suggests that Sun5 could be subjected to such post-translational modifications. This is in agreement with the presence of the two close bands observed when the Sun5 plasmid was transfected in HEK cells (Fig. 1AB). To address a possible glycosylation of Sun5 during its transit through the Golgi apparatus, nuclear protein extracts from spermatogenic cells were subjected to SDS page followed by Western blot analysis. Interestingly, in these extracts, we confirmed the presence of a doublet around 40 kDa but we also evidenced a new band around 55 kDa, immunodecorated by both antibodies (Fig. 4B, red arrows). The fact, that both antibodies immunodecorated the same band, demonstrates that the signal is likely specific and shows that Sun5 is strongly modified during its transit through the Golgi apparatus. Numerous N and O glycosylation sites are predicted to be present on the protein and the band at 55 KDa could correspond to a glycosylated protein. To address this question, we incubated testis extracts during 15 hours at 37°C with a mix of deglycosylation enzymes. First we controlled that our protocol was able to remove glycosyl residues by using bovine fetuin as a glycosylated control protein (panel A of S5 Fig.). Contrary to testis extracts incubated without enzymes (Fig. 4C, lane 2), the band at 55 KDa was no longer observable after deglycosylation treatment (Fig. 4C, Lanes 3), confirming that the band at 55 KDa corresponds to a post-translationally modified Sun5. Unexpectedly, the process of incubation by itself (i.e. without enzymes), modified the Sun5 signal: the doublet at 40 KDa was no longer observable (Fig. 4C, Lanes 1 versus 2), suggesting that Sun5 is highly sensitive to degradation when it is deglycosylated. Protein loads before (lane 1) and after treatment (lanes 2 and 3) were controlled with TGX stain free precast gels and no dramatic differences were observed (Panel B of S5 Fig.). Moreover, a band around 95 KDa was also observed (Fig. 4B, black arrow) which likely corresponds to a protein complex containing Sun5 because this band was no longer present when the reducing conditions were increased by boiling the sample before gel loading (Fig. 4D). Protein loads, controlled with TGX stain free precast gels, shows that similar amount of protein were loaded (panel C of S5 Fig.).

During spermiogenesis, and particularly during spermatid elongation, Sun5 was moved back along an antero-posterior axis (Fig. 5AB). This movement seems to occur earlier at the border of the acrosomal cap than on the opposite side of the spermatid. Again, no Sun5 staining was observed in front of the acrosome (Fig. 5AB). At this stage, Sun5 was no longer co-localized with the Cis-Golgi, suggesting that most Sun5 proteins had joined their final target in the nuclear envelope (Fig. 5B). It was reported that Sun1 protein interacts with lamin A [15] and interestingly we show that Sun5 presented a similar localization to lamin B1 in the round spermatids, that is, close to the NE, except in front of the acrosomal vesicle (Fig. 5C, white arrows). This may suggest that Sun5 is a potential partner of lamin B1. Lamin B1 is however quickly removed at the end of the round spermatid stage and no fluorescent signal was observed in early condensing spermatids (Fig. 5C, yellow arrow heads). This result thus demonstrates that Sun5 movement during late spermiogenesis is not dependent of lamin B1.

Finally, we investigated the presence of Sun5 in mature epididymal sperm. Due to the great compaction of the sperm nucleus and the structures of the peri-nuclear theca, the staining of the NE may be difficult. Sperm nuclei were thus decondensed with 10 mM DTT. We have



**Fig 5. Sun5 is removed during spermiogenesis along an antero-caudal axis.** (A) In early condensing spermatids, Sun5 is located at the base of the nucleus. Elongating spermatids co-stained with anti-Sp56 antibodies (A1, red) and anti-Sun5 Ab1 (A2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). Arrow heads show specific Sun5 staining at the implantation fossa in late condensing spermatids. (B) In early condensing spermatids, Sun5 is no longer present in Golgi apparatus. Elongating spermatids co-stained with anti-GM130 antibodies (B1, purple) and anti-Sun5 Ab1 (B2, green) and



counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). (C) In round spermatids (white arrows), Lamin B1 (purple) is not located in front of the acrosomal vesicle (evidenced by anti-Sp56 antibodies green), showing that lamin B1 and Sun5 were both excluded from the acrosomal area. In early condensing spermatids (yellow arrow heads), Lamin B1 (purple) is absent. Cells were counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue).

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g005

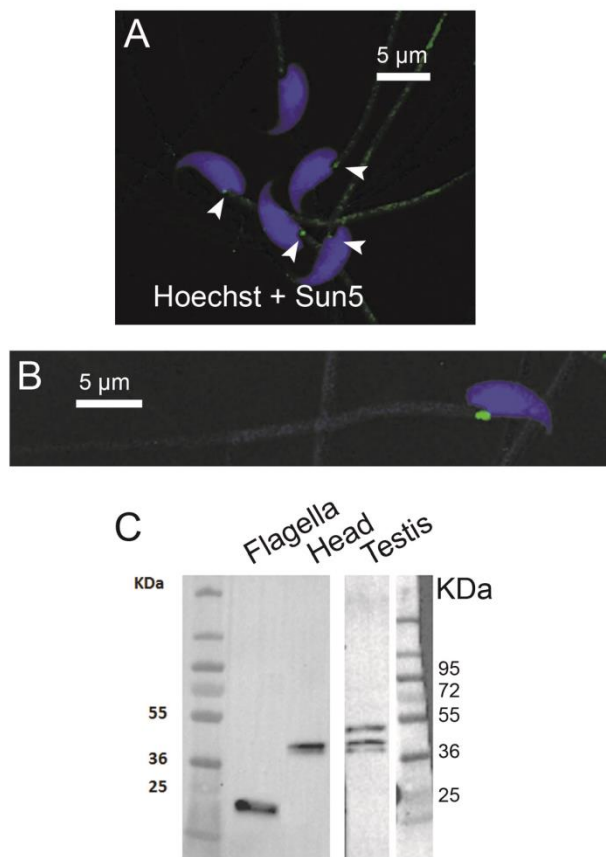
previously shown that this method allows evidencing protamine, a protein deeply embedded in the nucleus [16]. In the epididymal sperm, Sun5 was observed in front of the sperm implantation fossa (Fig. 6AB, white arrow heads). This specific pattern of localization was already observable in late condensing spermatids (Fig. 5A2, white arrow heads). It is worth noting that a similar staining was observed on sperm not treated with DTT, and thus does not correspond to an artifact induced by DTT treatment. A faint staining was also observed in the flagellum of mature epididymal sperm (Fig. 6AB). In order to validate both staining, we compared the band patterns obtained by Western blotting of heads and flagella fractions (Fig. 6C). The heads and flagella fractions were obtained by mild sonication. In the flagella fraction, the Sun5 antibodies immunodecorated a band at 25 kDa only, suggesting that flagellum staining was not specific because Sun5 MW is around 40 kDa.

All the data presented above show that Sun5 is produced early during the meiosis and traffics through the Golgi apparatus before reaching the NE of the round spermatid. The localization of Sun5 is highly controlled since it is excluded from the NE facing the acrosome. To get better insights in the mechanism allowing its exclusion from this specific area, we measured Sun5 localization in spermatogenic cells from *Dpy19l2* KO males; *Dpy19l2* is a transmembrane protein of the INM and its absence leads to acrosome detachment and reorganization of proteins of the NE [5]. The absence of *Dpy19l2* led to a striking relocation of Sun5 towards the nuclear envelope area previously involved in acrosomal vesicle attachment, as witnessed by the full ring shape of Sun5 staining around the nucleus (Fig. 7AB). This relocation, which is concomitant with acrosome vesicle detachment, confirms that Sun5 is excluded from the acrosomal vesicle attachment area. At later stages, the absence of *Dpy19l2* did not modify the movement of Sun5 along the antero-posterior axis (Fig. 7C) and the vanishing of the protein in late condensing spermatids (Fig. 7D). In epididymal sperm from *Dpy19l2* KO males, the specific staining in the implantation fossa was lost in most of sperm and the flagellum staining was similar to that observed in WT flagellum (Fig. 7E) and is thus likely to be unspecific as well. Finally, a recent report showed that *Dpy19*, the ortholog of *Dpy19l2* in *C. elegans*, is a C-mannosyltransferase [17]. Sun5, as a nuclear envelope protein may be glycosylated by *Dpy19l2*. To test this hypothesis, we observed the pattern of Sun5 bands in WB of a nuclear extract from *Dpy19l2* KO testis. The absence of *Dpy19l2* did not modify the pattern of post-translational modifications (Fig. 7F), both the doublet at 40 kDa and the band at 55 kDa were observed. This result suggests that *Dpy19l2* is not involved in the glycosylation process of Sun5.

## Discussion

During spermiogenesis, the spermatid nucleus is deeply modified. The intervening modifications involve changes in DNA packaging, nuclear shape and a reorganization of the NE structure. However, the function of the integral membrane proteins of the NE and in particular of Sun proteins during spermatid elongation remains poorly understood and deserve to be investigated. As indicated in the introduction, all Sun proteins are present in spermatogenic cells and their expression and localization are strongly controlled. However, their distinct roles in spermiogenesis remain to be unraveled [9,18].

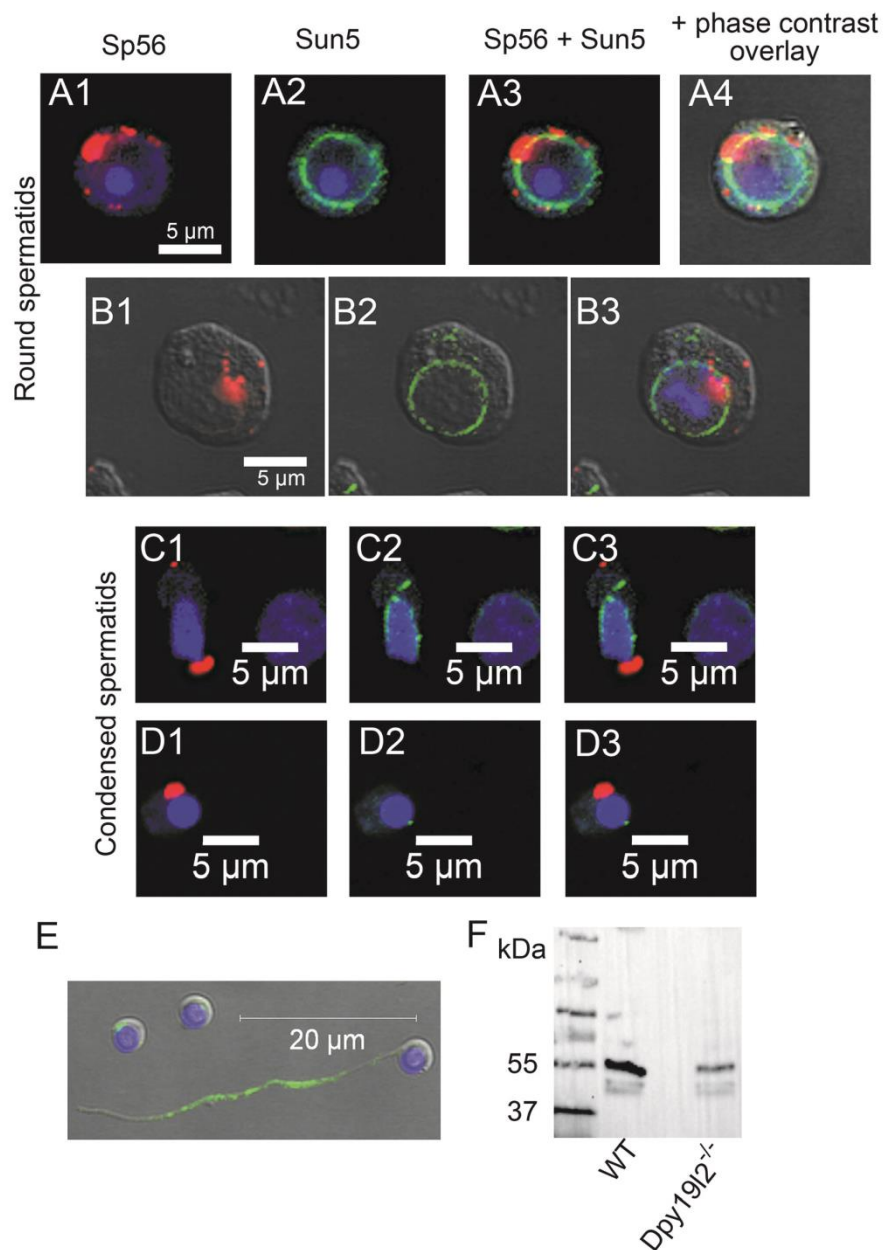
Herein, we focused our work on Sun5 localization during spermatogenesis. We showed that Sun5 shares common properties with other Sun proteins. First, as described for Sun1 and Sun3, Sun5 is located in the NE of the round spermatids. Moreover, we demonstrated that like



**Fig 6. Epididymal sperm presents a punctiform staining at the implantation fossa. (A, B)** Sun5 staining is located at the implantation fossa in epididymal sperm (arrow heads). **(C)** Sperm were fractionated by mild sonication allowing separating head and flagella fractions and resolved proteins by SDS PAGE of both fractions were subjected to Western blotting analysis with Ab2 Sun5 antibody. As control, testis nuclear protein extracts were subjected to Western blotting analysis in the same trial.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g006

the other Sun proteins studied in spermatogenic cells so far [9], Sun5 is excluded from the region facing the acrosomal vesicle. Sun proteins thus share common structural properties allowing their positioning into the NE and their exclusion from the acrosomal vesicle area. The molecular determinants of Sun exclusion from the acrosomal vesicle area have not yet been characterized. Furthermore, we showed that the detachment of the acrosomal vesicle due to the absence of Dpy19l2 led to an important relocalization of Sun5. In a previous report we showed that acrosome detachment leads to the vanishing of a specific nucleoplasmic structure called the nuclear dense lamina which does not contain any lamin [5]. This structure could be involved in Sun exclusion and would deserve further studies. Sun3 and Sun1 present a complementary localization in round spermatids: Sun1 is located at the posterior pole and Sun3 at an intermediate location between the anterior and the posterior poles [9]. The molecular cause of such mutual exclusion is not understood so far. In comparison, we showed that the area of



**Fig 7. Detachment of the acrosome in spermatids from *Dpy19l2* KO males leads to a relocalization of Sun5.** (A, B) Round spermatids co-stained with anti-Sp56 antibodies (A1, B1, red) and anti-Sun5 Ab1 (A2, B2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A3 corresponds to overlay and A4 and B3 correspond to overlay + phase contrast. (C) Sun5 removal during spermiogenesis along the antero-caudal axis is not modified in *Dpy19l2* KO condensed spermatids. Elongating *Dpy19l2* KO spermatids co-stained with anti-Sp56 antibody (C1, red) and anti-Sun5 Ab1 (C2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue); C3 overlay. (D) Similar stainings in fully condensed spermatids showing the almost complete vanishing of Sun5. (E) Absence of Sun5 staining in *Dpy19l2* KO sperm head. (F) Western blot of nuclear protein extracts from WT and *Dpy19l2* KO testis revealed with anti-Sun5 Ab1. The absence of *Dpy19l2* did not modify Sun5 glycosylation pattern.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g007



Sun5 localization is unique and encompasses Sun1 and Sun3 localizations. Moreover, Sun5 presents some specific features in comparison to other Sun proteins. First, epididymal sperm present a staining in the implantation fossa, a localization where Sun1 is absent [9]. As a nuclear envelope protein, the location of Sun5 in this peculiar area is coherent with the presence of a redundant nuclear envelope at the base of the sperm head as showed in bull and mouse [19]. Although epididymal sperm exhibit compact structures, it is worth noting that Sun5 staining in sperm were performed in conditions allowing us to evidence other proteins (like protamines) located deeper in the nucleus [16], and the presence of Sun5 in other locations is unlikely. Concerning Sun5 staining in the flagellum of mature epididymal sperm, the anti-Sun5 Ab1 antibodies immunodecorated the flagellum in both WT and *Dpy19l2* KO mature sperm. However, we observed no bands at 40 or 55 KDa in Western blot carried out with the flagella fraction. On the other hand a band at 25 KDa was observed. This band is likely to be non-specific because the smallest alternative transcript identified (XP\_006500438), which code for proteins with a molecular weight of 29 KDa does not contains the TLPEDTTHSGRPRRGVQRSY sequence found on the main transcript and which was used for antibody design. It is important to notice that this 25 KDa band was not observed in Western blots performed from whole testis proteins because there are relatively few mature sperms in the testes compared to other cell types and the blots were carried out on enriched nuclear proteins.

In this report, we also showed that Sun5 is clearly present in the cytoplasm at the pachytene stage in an uncharacterized membranous compartment. It is worth noting that at this stage, Western blotting experiment evidenced only one band around 40 KDa, a result coherent with its transit through the Golgi apparatus at the round spermatid stage. This uncharacterized membranous compartment may correspond to the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment (ERGIC) because it has been shown that integral proteins of the NE including emerin, another protein of the INM, transit through the ERGIC before retrograde transport to the nuclear envelope [20]. Such a location was already suggested for Sun1 [21]. The transit of Sun5 through the Golgi is associated with deep post-translational modifications. In HEK cells and spermatogenic cells, three different antibodies immunodecorated two close bands around 40 kDa. Two of these antibodies target different parts of the mouse Sun5 protein and one the DDK-tag of the human Sun5-DDK protein. It is thus very unlikely that these bands correspond to a non-specific staining, but rather correspond to post-translational modifications. Interestingly, Sun2 is heavily phosphorylated in HeLa cells treated with phosphatase inhibitors [22]. Moreover, in spermatogenic cells, a new band at 55 kDa was immunodecorated. Again this band was revealed by two different primary antibodies revealed by two different secondary HRP antibodies (rabbit versus rat) and unlikely correspond to an unspecific marking. Moreover, the expression of Sun5 has been extensively studied and 5 splice variants have been identified. The main transcript (NM\_029599.1) codes for a 348 amino acids (aa) protein (NP\_083875.1) with an estimated molecular weight of 39 805 Da. Four alternative transcripts have been identified which code for proteins ranging from 259 to 382 aa with molecular weight ranging from 29545 to 43069 Da (XP\_006500438, XP\_006500436.1, XP\_006500437.1, XP\_006500435.1). It is extremely unlikely that a larger transcript exists. Finally this band was no longer observable after a treatment with deglycosylation enzymes. Altogether these data show that Sun5 is post-translationally modified. To our knowledge, it is the first description of glycosyl modifications of a Sun protein. The fact that Sun5 is post-translationally modified is confirmed by the fact that numerous putative glycosylation sites are predicted using programs detecting post-translational modifications ([http://www.expasy.org/proteomics/post-translational\\_modification](http://www.expasy.org/proteomics/post-translational_modification)). Although the cellular function associated with this glycosylation is currently unknown, it is important to notice that glycosylation of nuclear envelope membrane proteins including nucleoporins is

important for the functional integrity of the nuclear envelope [23]. Interestingly, antibodies also evidenced a band around 95 KDa, which was no longer observable when reducing conditions were increased. This band likely corresponds to a complex containing Sun5. Because the MW of the complex is close to the MW of the Sun 5 dimer and because it has clearly been shown that Sun proteins are associated in oligomers [24], this band likely corresponds to a Sun5 dimer. Remnants of dimers or trimers in WB is very usual for oligomers in weak reducing conditions (without boiling), especially when proteins are difficult to solubilize (it is the case for Sun5, as showed previously [11]). Such a band was also observed in WB performed with extracts from HEK cells transfected with Sun5-DDK plasmid and revealed with a third primary antibody (anti-DDK) and a different secondary antibody (anti mouse HRP). Because Sun proteins have been described to mainly function as trimers [22], the observed dimers may therefore correspond to a partial Sun5 trimer dissociation during protein solubilization. This suggests that Sun5, like other Sun proteins, might also be associated in trimers. The fact that no trimers were observed could be due to a low solubility of the trimeric structure.

The results presented above are clearly different from what was described in previous reports showing that Sun5 is mainly expressed during meiosis in the reticulum [12] and that Sun5 is located in the NE facing the acrosome and is not post-translationally modified [11]. The main difference between our experiments and previous reports was the use of different antibodies. We did test the commercially available antibody used in the previous reports [11] and, despite numerous trials with different conditions, we were unable to reproduce the previously published data. The results presented herein have been obtained using three different antibodies, one of which was new. Their specificity was challenged using two different plasmids containing either mouse Sun5 or human SUN5 DNA sequences in both IHC and Western blot experiments. In IHC, a coherent staining was observed as a ring surrounding the nucleus. A similar staining had already been described with an anti DDK antibody when cells were transfected with Sun5-DDK [5]. We never observed any staining in non transfected cells. The results obtained with different antibodies combinations were highly concordant and altogether, these control experiments brought a high level of confidence in our data.

So far, the interactions between the organelles and the nucleus have always been dependent on the formation of LINC complexes due to the binding of Sun and Kash domain proteins. Herein, we demonstrated by IHC that Sun5 is undetectable in the NE facing the acrosome and thus that the attachment of the acroplaxome on the nucleus does not likely depend on the formation of a LINC complexes involving Sun5. Moreover, several publications on the localization of other Sun proteins in spermatogenic cells, shows that they are also absent from the NE facing the acrosome [8,9,18]. Altogether, these results suggest that the attachment of the acroplaxome on the NE does not likely depend on Sun proteins and seems thus unique. In conclusion, the only protein described so far to be involved in acrosomal attachment remains Dpy19L2. The molecular partners of Dpy19L2 located in the nucleoplasm and in the ONM remain to be characterized. Finally, this data will avoid inverse genetic studies focusing on this protein in the framework of globozoospermia.

## Material and Methods

### Ethics Statement

All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of animals in scientific investigations with the approval of the local Ethical Committee, (Grenoble-Institut des Neurosciences—ethical committee, Study agreement number 004). Mice were killed by cervical dislocation.

## Animals

*Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Mutant Mouse Regional Resource Center, University of California, Davis, CA. Although gene knock-out had been checked by PCR/Southern ([http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di\\_032274PCR\\_Protocol.pdf](http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di_032274PCR_Protocol.pdf)), we confirmed by RT-PCR that *Dpy19l2* transcripts were absent [5].

## Cell Culture and transfection

HEK-293 and NIH/3T3 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen, France) and transiently transfected either with human orthologs Cter-DDK-tagged Sun5 or mouse Sun5 containing pCMV6 plasmids (from Origene, Rockville, MD, US), using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Two days after transfection, transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) before immunochemistry experiments.

## Testicular Cell dissociation

C57BL6 male or *Dpy19l2* KO mice (8 weeks old) were killed by cervical dislocation. The testes were surgically removed and placed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature. The tunica albuginea was removed from the testes with sterile forceps and discarded. Then, the testes were incubated in 3 ml of a solution containing 1 mg/ml collagenase and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 12.1 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Na-Lactate, 150 mM NaCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub> pH = 7) and agitated horizontally at a maximum of 120 rpm for 30 min at 25°C. The dispersed seminiferous tubules were then washed with PBS and cut thinly. Cells were dissociated by gently pipetting, filtered through a 70 μm filter and then pelleted by centrifugation at 500 g for 10 minutes. Cells were suspended in 1 ml PBS and fixed with 4% PFA solution, washed with PBS and finally layered onto polylysine-coated slides. For WB experiments of purified pachytene spermatocytes, cell suspensions were loaded into a sedimentation chamber according to procedures developed for murine spermatogenic cells for velocity sedimentation under unit gravity separation [25].

## Nuclear protein preparation

Enriched nuclear proteins samples were prepared essentially as described by Korfali et al [26], using dissociated testicular cells. In brief, cells were dispersed in 3 ml of ice-cold hypotonic buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2 mM DTT) containing Complete protease inhibitor cocktail (Roche) on ice. After 10 min, cells were lysed by application of 20 strokes in a Dounce hand homogenizer. Nuclei were then separated from the cells by a sucrose gradient (0.22 M to 0.9 M). Nuclei were washed in PBS buffer and pelleted at 2000 g at 4°C for 15 min. Nuclei were then solubilized in buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% triton X-100, 100 U/ml DNase and complete protease inhibitor cocktail (Roche) incubated for 4 hours at 4°C under agitation. After centrifugation at 20 000 g for 30 min at 4°C, the soluble supernatant was conserved and subjected to SDS-PAGE.

## Western Blotting analysis

Proteins of enriched nuclear preparation were diluted in ultra pure water and mixed with 5X protein sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue as the tracking dye), and samples were heated at 95°C for 5 minutes when required. Samples were then separated on 4–20% SDS-PAGE gels and transferred into PVDF membranes (Millipore) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membranes

were blocked in 6% non-fat dry milk in PBS 0.1% Tween and incubated overnight at 4°C with Ab1 anti-Sun5 (1/1000), Ab2 anti-Sun5 (1:500) or anti-DDK (1:1000) antibodies; this was followed by 30 min of incubation with a matched horseradish peroxidase labeled secondary antibody (1/10,000). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chimidoc Station (Biorad). Western blotting procedures were repeated at least 3 times per sample.

### Immunohistochemistry (IHC)

For IHC, heat antigen retrieval was performed by boiling slides immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, 0.05% Tween 20, pH 6.0 during ~ 15 min. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C in PBS with 2% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100. Slides were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and counterstained with Hoechst 33342. Images were taken by confocal microscopy (Zeiss LSM 710), and processed using Zen 2009.

### Antibodies

Mouse Sperm Protein Sp56 Monoclonal Antibodies and Golgi matrix protein GM130 (610822), two monoclonal antibodies raised in mouse, were from QED Bioscience; Lamin B1 antibodies were from Abcam (Ab16048); DDK-tag antibodies were from Origene, anti-KDEL from Calbiochem Millipore (Mouse mAb 10C3, 1/200). Two Sun5 antibodies were used: Ab1 corresponds to Spag4l antibody raised in rabbit from Proteintech antibodies (17495-1-AP) and was used from 1/100 to 1/200 in IHC and Ab2 corresponds to laboratory designed antibodies targeting the peptide CTLPEDTTHSGRPRRGVQRSY and corresponding to amino acids 11–31 of the mouse Sun5 and raised in rat.

### Enzymatic deglycosylation

Samples (50 µg of total protein per reaction) were incubated at 37°C for 15 hours under non-reducing conditions with a mixture of different glycosidases (PNGase F, Neuraminidase, O-glycosidase,  $\beta$  1–4 Galactosidase,  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (Protein Deglycosylation Kit, Promega) and protease inhibitors (Roche). Deglycosylated proteins were separated on 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad) followed by western blot analysis, using the same antisera described above for Sun 5 protein. The control sample was incubated without glycosidase mix and a positively glycosylated protein (fetuin) was provided as a substrate control.

### Fractionation of sperm heads and tails

Cauda epididymal sperm, obtained from male mice (OF1) was collected in PBS buffer and allowed to swim for 10 minutes at 37°C. Sperm heads and tails were separated by mild sonication on ice (five times ON, five times OFF) using Ultrasonic sonicator (Delta labo). The sample was then layered on a discontinuous Percoll density gradient composed of six layers containing 100, 60, 34, 26, 23, and 21% Percoll. All of the percoll solutions were diluted in M2 medium (Sigma-Aldrich, France). The gradient was centrifuged at 600 g for 20 min at 4°C. After centrifugation, sperm heads were recovered in the fraction 100% whereas sperm tails were recovered in the fraction 60%. Both samples were washed in PBS buffer, and then the pellets were resuspended in Laemmli sample buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol, and boiled for 5 minutes at 100°C. After centrifugation, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol was added to the supernatants, and the mixture was boiled again for 5 minutes. Protein extracts were loaded and subjected to SDS-PAGE as described above.



## Funding

This study was supported by grants from Gravit Foundation (to CA), from the Agence Nationale de la Recherche (Grant ICG2I to PR and CA).

## Supporting Information

**S1 Fig. No staining is observed in spermatogenic cells treated with only secondary antibody.** No staining is observed in pachytene spermatocytes (PS), round spermatids (RS) or elongating spermatids (SE).  
(JPG)

**S2 Fig. Co-staining of pachytene spermatocytes with KDEL antibodies (reticulum marker, red) and Sun 5 antibodies (green).** (A) In pachytene, a punctiform staining is observed within the cytoplasm but no staining were observed around the nucleus (A1). The reticulum staining is observed within the reticulum (A2). (A3) overlay. Most of the green and red staining were not superposed. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (B) Similar pattern of KDEL and Sun5 staining in a different pachytene spermatocyte.  
(JPG)

**S3 Fig. Sun5 is located in the nuclear envelope in round spermatids and excluded from the NE facing the acrosome (A-E).** Round spermatids co-stained with anti-Sp56 (red) and anti-Sun5 Ab1 (green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A-D panels show examples of the absence of staining in the NE facing the acrosome. A and E panels: examples of cells showing that Sun5 staining is located more externally than Sp56 Staining. Arrow heads indicate the Sun5 staining which was not bound to the nuclear envelope.  
(JPG)

**S4 Fig. NE-unbound Sun5 staining co-localizes with the Golgi apparatus in round spermatids.** Round spermatids were co-stained with anti-Sun5 antibody (A1, B1, C1, green staining) and with anti-GM130 antibody to evidence the Cis-Golgi (A2, B2, C2, red staining) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus. Overlays of GM130 and Sun 5 staining show that NE-unbound Sun5 staining co-localizes with the Golgi Apparatus (A3, B3, C3, arrow heads).  
(JPG)

**S5 Fig. Control data of deglycosylation experiments.** (A) Control showing that our deglycosylation protocol is able to remove glycosyl residues of bovine fetuin. (–) corresponds to fetuin incubated at 37°C for 15 hours in the absence of enzymes and (+) to fetuin incubated at 37°C for 15 hours with a mixture containing different glycosidases. (B) Protein loads were controlled with TGX stain free precast gels. Lane 1 corresponds to testis proteins which were conserved at 4°C during the deglycosylation protocol, lane 2 to testis proteins incubated at 37°C for 15 hours with a mixture of different glycosidases, lane 3 to testis proteins incubated at 37°C for 15 hours in the buffer without enzymes and lane 4 to molecular weights. (C) Protein load, corresponding to the Western blot presented in Fig. 4D, demonstrates that similar amounts of protein were loaded.  
(JPG)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CA PR. Performed the experiments: SY JE RAN VP. Analyzed the data: SY JE RAN PR CA. Contributed reagents/materials/analysis tools: TK. Wrote the paper: CA.

## References

1. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003) Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14: 4628–4640. PMID: [14551252](#)
2. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2011) Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* 1: 221–230. PMID: [22319670](#)
3. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C et al. (2011) A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 88: 351–361. doi: [10.1016/j.ajhg.2011.02.007](#) PMID: [21397064](#)
4. Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C et al. (2012) MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod* 27: 2549–2558. doi: [10.1093/humrep/des160](#) PMID: [22627659](#)
5. Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delarochette J, Yassine S, Novella C et al. (2012) Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 139: 2955–2965. doi: [10.1242/dev.077982](#) PMID: [22764053](#)
6. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA et al. (2005) The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* 118: 3419–3430. PMID: [16079285](#)
7. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B et al. (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172: 41–53. PMID: [16380439](#)
8. Shao X, Tarnasky HA, Lee JP, Oko R, van der Hoorn FA (1999) Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev Biol* 211: 109–123. PMID: [10373309](#)
9. Gob E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M (2010) Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One* 5: e12072. doi: [10.1371/journal.pone.0012072](#) PMID: [20711465](#)
10. Kracklauer MP, Wiora HM, Deery WJ, Chen X, Bolival B Jr., Romanowicz D et al. (2010) The Drosophila SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J Cell Sci* 123: 2763–2772. doi: [10.1242/jcs.066589](#) PMID: [20647369](#)
11. Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S (2011) SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod* 17: 207–218. doi: [10.1093/molehr/gaq099](#) PMID: [21159740](#)
12. Jiang XZ, Yang MG, Huang LH, Li CQ, Xing XW (2011) SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol* 30: 875–882. doi: [10.1089/dna.2010.1161](#) PMID: [21711156](#)
13. Kim KS, Cha MC, Gerton GL (2001) Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod* 64: 36–43. PMID: [11133656](#)
14. Hodzic DM, Yeater DB, Bengtsson L, Otto H, Stahl PD (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* 279: 25805–25812. PMID: [15082709](#)
15. Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM et al. (2006) SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 26: 3738–3751. PMID: [16648470](#)
16. Yassine S, Escoffier J, Martinez G, Coutton C, Karaouzene T, Zouari R et al. (2014) Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development. *Mol Hum Reprod pii: gau099* [Epub ahead of print].
17. Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L, Bakker H (2013) C. elegans DPY-19 is a C-mannosyl-transferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol Cell* 50: 295–302. doi: [10.1016/j.molcel.2013.03.003](#) PMID: [23562325](#)
18. Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M (2007) SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 12: 863–872. PMID: [17543860](#)

19. Ho HC, Suarez SS (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68: 1590–1596. PMID: [12606347](#)
20. Tran D, Chalhoub A, Schooley A, Zhang W, Ngsee JK (2012) A mutation in VAPB that causes amyotrophic lateral sclerosis also causes a nuclear envelope defect. *J Cell Sci* 125: 2831–2836. doi: [10.1242/jcs.102111](#) PMID: [22454507](#)
21. Chi YH, Chen CY, Jeang KT (2012) Reversal of laminopathies: the curious case of SUN1. *Nucleus* 3: 418–421. doi: [10.4161/nucl.21714](#) PMID: [22895095](#)
22. Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M et al. (2002) A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* 1: 517–527. PMID: [12239280](#)
23. Li B, Kohler JJ (2014) Glycosylation of the nuclear pore. *Traffic* 15: 347–361. doi: [10.1111/tra.12150](#) PMID: [24423194](#)
24. Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, Schwartz TU (2012) LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* 149: 1035–1047. doi: [10.1016/j.cell.2012.03.046](#) PMID: [22632968](#)
25. Romrell LJ, Bellve AR, Fawcett DW (1976) Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol* 49: 119–131. PMID: [176074](#)
26. Korfali N, Fairley EA, Swanson SK, Florens L, Schirmer EC (2009) Use of sequential chemical extractions to purify nuclear membrane proteins for proteomics identification. *Methods Mol Biol* 528: 201–225. doi: [10.1007/978-1-60327-310-7\\_15](#) PMID: [19153695](#)







## Résumé

La dégradation des fonctions de reproduction masculine dans les dernières décennies, et par suite, la baisse du taux de fertilité chez l'homme a renforcé les démarches de recherche des causes d'infertilité masculine, qu'elles soient génétiques, ou environnementales, mettant en œuvre les perturbateurs endocriniens ou d'autres produits reprotoxiques. Par ailleurs, les traitements palliatifs tels que l'aide médicale à la procréation ne permettent qu'à 1 couple sur deux d'obtenir une grossesse. La recherche vise donc également à définir de nouvelles pistes d'amélioration de ces techniques. Les phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>) sont des enzymes abondamment exprimées dans les organes reproducteurs mâles, le sperme éjaculé et dans le tractus génital femelle. Elles jouent des rôles importants dans la capacitation, la réaction acrosomique (RA) et la fécondation. Nous avons montré au laboratoire que la PLA2 murine sécrétée de groupe X (mGX) est présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris. Elle est libérée au cours de la RA et s'avère un inducteur puissant de la RA. Les mécanismes permettant ces effets sont encore mal connus. Par l'utilisation d'inducteurs et d'inhibiteurs des PLA2, sur des modèles murins wild type ou KO pour certaines PLA2, ce travail montre que durant la capacitation, l'activation des iPLA2  $\beta$  permet de déclencher une RA spontanée dans une sous-population spécifique de spermatozoïdes. Au cours de la RA induite par la progestérone (P4), On a pu aussi valoriser le rôle des iPLA2  $\beta$  qui initie la cascade de la RA et permet que les sPLA2 soient activées pour amplifier le déroulement de la réaction acrosomique. Par ailleurs, ce travail montre que l'effet de mGX sur le taux de fécondation et de développement embryonnaire ne dépend pas du taux de la RA. Cet effet obtenu grâce à mGX n'est pas observé avec d'autres sPLA2 (murine ou humaine), ni avec la P4 ce qui lui confère une propriété espèce dépendante.

Mots clés : Fécondation, réaction acrosomique, phospholipases A2, spermatozoïdes, souris KO

## Abstract

For the last ten years, the impairment of male reproductive functions has highly increased, as has the use of assisted reproductive techniques. Despite this evolution, the pregnancy rates obtained through in vitro fertilization (IVF) remain low, as only one in two couples will obtain a pregnancy after 4 attempts. Research must discover new ways to gain in reproductive impact. Hence, many studies have recently been developed to test molecules that could improve the IVF results. Phospholipases A2 (PLA2s) come under this category. They play an important role, because of their abundant expression in male reproductive organs, ejaculated sperm and the female tract. Several studies have suggested a role for members of the secreted phospholipase A2 family in capacitation, the acrosome reaction (AR), and fertilization. We demonstrated previously that sperm from mGX knock-out mice had a severely impaired fertilization potential *in vitro*, but the molecular nature of these enzymes and their specific functions have remained elusive. Our aims were to study the mechanism of the acrosome reaction by focusing on different kinds of PLA2 using inhibitors and knockout mice for each type of PLA2. We demonstrate the importance of iPLA<sub>2</sub> $\beta$  in the spontaneous AR that occurs during capacitation. We also show that iPLA<sub>2</sub> $\beta$  and sPLA<sub>2</sub> of group X are both involved in progesterone (P4)-induced AR in mouse sperm. In addition we show that in the mouse neither P4 nor any of the other sPLA2s tested are able to mimic the IVF improvement obtained with mGX-treatment. We demonstrate that the improvement obtained with phospholipase A2 murine group X is not dependent on the rate of the AR. These results demonstrate that sPLA2s are not commutable in the context of mouse sperm fertility, indicating that group X sPLA2 is unique to improve fertility outcome.

Key word: fertilization, acrosome reaction, phospholipases A2, spermatozoon, Knock out mice

## *Références bibliographiques*

- al-Somai, N., R. Vishwanath, P. Shannon, and P.C. Molan. 1994. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on motility of bull sperm. *Reprod Fertil Dev.* 6:165-171.
- Alasmari, W., C.L. Barratt, S.J. Publicover, K.M. Whalley, E. Foster, V. Kay, S. Martins da Silva, and S.K. Oxenham. 2013. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Human reproduction.* 28:866-876.
- Alfieri, J.A., A.D. Martin, J. Takeda, G. Kondoh, D.G. Myles, and P. Primakoff. 2003. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *Journal of cell science.* 116:2149-2155.
- Amann, R.P., and L.C. Griel, Jr. 1974. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. *J Dairy Sci.* 57:212-219.
- Ancian, P., G. Lambeau, and M. Lazdunski. 1995. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry.* 34:13146-13151.
- Arai, H., H. Koizumi, J. Aoki, and K. Inoue. 2002. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem.* 131:635-640.
- Aricescu, A.R., and E.Y. Jones. 2007. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Current opinion in cell biology.* 19:543-550.
- Arnoult, C., R.A. Cardullo, J.R. Lemos, and H.M. Florman. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13004-13009.
- Arnoult, C., I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz, and H.M. Florman. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6757-6762.
- Asano, A., J.L. Nelson-Harrington, and A.J. Travis. 2013a. Membrane rafts regulate phospholipase B activation in murine sperm. *Commun Integr Biol.* 6:e27362.
- Asano, A., J.L. Nelson-Harrington, and A.J. Travis. 2013b. Phospholipase B is activated in response to sterol removal and stimulates acrosome exocytosis in murine sperm. *J Biol Chem.* 288:28104-28115.
- Atreja, S.K., and S.R. Anand. 1985. Phospholipase and lysophospholipase activities of goat spermatozoa in transit from the caput to the cauda epididymidis. *J Reprod Fertil.* 74:687-691.
- Aveldano, M.I., N.P. Rotstein, and N.T. Vermouth. 1992. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. *Biochem J.* 283 ( Pt 1):235-241.
- Baba, D., S. Kashiwabara, A. Honda, K. Yamagata, Q. Wu, M. Ikawa, M. Okabe, and T. Baba. 2002. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem.* 277:30310-30314.
- Bahat, A., and M. Eisenbach. 2010. Human sperm chemotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> channel. *Biol Reprod.* 82:606-616.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz, and G. Forti. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1:d189-205.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, M. Muratori, and G. Forti. 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 5:E110-123.
- Balsinde, J., M.A. Balboa, and E.A. Dennis. 2000. Group IV cytosolic phospholipase A2 activation by diacylglycerol pyrophosphate in murine P388D1 macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 905:11-15.

- Bao, S., D.J. Miller, Z. Ma, M. Wohltmann, G. Eng, S. Ramanadham, K. Moley, and J. Turk. 2004. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem*. 279:38194-38200.
- Barraud-Lange, V., N. Naud-Barriant, L. Saffar, L. Gattegno, B. Ducot, A.S. Drillet, M. Bomsel, J.P. Wolf, and A. Ziyat. 2007. Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC developmental biology*. 7:102.
- Bayas, M.V., A. Kearney, A. Avramovic, P.A. van der Merwe, and D.E. Leckband. 2007. Impact of salt bridges on the equilibrium binding and adhesion of human CD2 and CD58. *The Journal of biological chemistry*. 282:5589-5596.
- Berditchevski, F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *Journal of cell science*. 114:4143-4151.
- Berditchevski, F., and E. Odintsova. 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *The Journal of cell biology*. 146:477-492.
- Berridge, M.J., and R.F. Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 312:315-321.
- Berridge, M.J., and R.F. Irvine. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 341:197-205.
- Bi, Y., W.M. Xu, H.Y. Wong, H. Zhu, Z.M. Zhou, H.C. Chan, and J.H. Sha. 2009. NYD-SP27, a novel intrinsic decapacitation factor in sperm. *Asian J Androl*. 11:229-239.
- Bird, G.S., G.M. Burgess, and J.W. Putney, Jr. 1993. Sulfhydryl reagents and cAMP-dependent kinase increase the sensitivity of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*. 268:17917-17923.
- Bize, I., G. Santander, P. Cabello, D. Driscoll, and C. Sharpe. 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod*. 44:398-403.
- Blackmore, P.F., and F.A. Lattanzio. 1991. Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem Biophys Res Commun*. 181:331-336.
- Bleil, J.D., and P.M. Wassarman. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*. 20:873-882.
- Bleil, J.D., and P.M. Wassarman. 1983. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Developmental biology*. 95:317-324.
- Blobel, C.P., T.G. Wolfsberg, C.W. Turck, D.G. Myles, P. Primakoff, and J.M. White. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. 356:248-252.
- Bowen, J.A., and J.S. Hunt. 2000. The role of integrins in reproduction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*. 223:331-343.
- Boxmeer, J.C., M. Smit, E. Utomo, J.C. Romijn, M.J. Eijkemans, J. Lindemans, J.S. Laven, N.S. Macklon, E.A. Steegers, and R.P. Steegers-Theunissen. 2009. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril*. 92:548-556.
- Bronson, R. 1998. Is the oocyte a non-professional phagocyte? *Human reproduction update*. 4:763-775.
- Brookes, P.S., Y. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, and S.S. Sheu. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287:C817-833.
- Buck, J., M.L. Sinclair, L. Schapal, M.J. Cann, and L.R. Levin. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:79-84.
- Burke, J.E., and E.A. Dennis. 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. 50 Suppl:S237-242.
- Caiazza, F., N.S. McCarthy, L. Young, A.D. Hill, B.J. Harvey, and W. Thomas. 2011. Cytosolic phospholipase A2-alpha expression in breast cancer is associated with EGFR expression and correlates with an adverse prognosis in luminal tumours. *Br J Cancer*. 104:338-344.

- Cejudo-Roman, A., F.M. Pinto, N. Subiran, C.G. Ravina, M. Fernandez-Sanchez, N. Perez-Hernandez, R. Perez, A. Pacheco, J. Irazusta, and L. Candenaz. 2013. The voltage-gated sodium channel nav1.8 is expressed in human sperm. *PLoS One*. 8:e76084.
- Chakrabarti, R., L. Cheng, P. Puri, D. Soler, and S. Vijayaraghavan. 2007. Protein phosphatase PP1 gamma 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. *Asian J Androl*. 9:445-452.
- Channon, J.Y., and C.C. Leslie. 1990. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem*. 265:5409-5413.
- Charrin, S., F. le Naour, O. Silvie, P.E. Milhiet, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2009. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal*. 420:133-154.
- Charrin, S., S. Manie, M. Billard, L. Ashman, D. Gerlier, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2003. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochemical and biophysical research communications*. 304:107-112.
- Chavez, J.C., J.L. de la Vega-Beltran, J. Escoffier, P.E. Visconti, C.L. Trevino, A. Darszon, L. Salkoff, and C.M. Santi. 2013. Ion permeabilities in mouse sperm reveal an external trigger for SLO3-dependent hyperpolarization. *PLoS One*. 8:e60578.
- Chavez, J.C., E.O. Hernandez-Gonzalez, E. Wertheimer, P.E. Visconti, A. Darszon, and C.L. Trevino. 2012. Participation of the Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers SLC26A3 and SLC26A6, the Cl<sup>-</sup> channel CFTR, and the regulatory factor SLC9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol Reprod*. 86:1-14.
- Chen, M.S., K.S. Tung, S.A. Coonrod, Y. Takahashi, D. Bigler, A. Chang, Y. Yamashita, P.W. Kincade, J.C. Herr, and J.M. White. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:11830-11835.
- Chen, Y., M.J. Cann, T.N. Litvin, V. Iourgenko, M.L. Sinclair, L.R. Levin, and J. Buck. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 289:625-628.
- Cheng, F.P., A.R. Fazeli, W.F. Voorhout, J.L. Tremoleda, M.M. Bevers, and B. Colenbrander. 1998a. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. *Int J Androl*. 21:57-66.
- Cheng, F.P., B.M. Gadella, W.F. Voorhout, A. Fazeli, M.M. Bevers, and B. Colenbrander. 1998b. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod*. 59:733-742.
- Chin, D., and A.R. Means. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*. 10:322-328.
- Chiu, P.C., B.S. Wong, M.K. Chung, K.K. Lam, R.T. Pang, K.F. Lee, S.B. Sumitro, S.K. Gupta, and W.S. Yeung. 2008. Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 79:869-877.
- Choi, D., E. Lee, S. Hwang, K. Jun, D. Kim, B.K. Yoon, H.S. Shin, and J.H. Lee. 2001. The biological significance of phospholipase C beta 1 gene mutation in mouse sperm in the acrosome reaction, fertilization, and embryo development. *J Assist Reprod Genet*. 18:305-310.
- Chung, J.J., B. Navarro, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, and D.E. Clapham. 2011. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun*. 2:153.
- Cisneros-Mejorado, A., L. Hernandez-Soberanis, M.C. Islas-Carbajal, and D. Sanchez. 2014. Capacitation and Ca<sup>2+</sup> influx in spermatozoa: role of CNG channels and protein kinase G. *Andrology*. 2:145-154.
- Cisneros-Mejorado, A., and D. Sanchez. 2011. A role for cyclic nucleotide-gated channels in the capacitation of mammalian sperm. *Proc West Pharmacol Soc*. 54:27-29.
- Cisneros-Mejorado, A., and D.P. Sanchez Herrera. 2012. cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation. *FEBS Lett*. 586:149-153.

- Cohen-Dayag, A., I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, and M. Eisenbach. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:11039-11043.
- Coonrod, S., S. Naaby-Hansen, J. Shetty, and J. Herr. 1999. PI-PLC releases a 25-40 kDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay. *Molecular human reproduction*. 5:1027-1033.
- Cooper, T.G. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*. 53:119-136.
- Cooper, T.G. 2007. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*. 9:533-539.
- Cooper, T.G., and C.H. Yeung. 2003. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech*. 61:28-38.
- Cross, J.C., Z. Werb, and S.J. Fisher. 1994. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 266:1508-1518.
- Cross, N.L., and P. Razy-Faulkner. 1997. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod*. 56:1169-1174.
- Cupillard, L., R. Mulherkar, N. Gomez, S. Kadam, E. Valentin, M. Lazdunski, and G. Lambeau. 1999. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J Biol Chem*. 274:7043-7051.
- Curfs, D.M., S.A. Ghesquiere, M.N. Vergouwe, I. van der Made, M.J. Gijbels, D.R. Greaves, J.S. Verbeek, M.H. Hofker, and M.P. de Winther. 2008. Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology. *J Biol Chem*. 283:21640-21648.
- Cyr, D.G., B. Robaire, and L. Hermo. 1995. Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. *Microsc Res Tech*. 30:54-66.
- Dacheux, J.L., S. Castella, J.L. Gatti, and F. Dacheux. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63:319-341.
- Dal Piaz, F., A. Casapullo, A. Randazzo, R. Riccio, P. Pucci, G. Marino, and L. Gomez-Paloma. 2002. Molecular basis of phospholipase A2 inhibition by petrosaspongiolide M. *Chembiochem*. 3:664-671.
- Darios, F., E. Connell, and B. Davletov. 2007. Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol*. 585:699-704.
- Darszon, A., J.J. Acevedo, B.E. Galindo, E.O. Hernandez-Gonzalez, T. Nishigaki, C.L. Trevino, C. Wood, and C. Beltran. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*. 131:977-988.
- Darszon, A., C. Beltran, R. Felix, T. Nishigaki, and C.L. Trevino. 2001. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol*. 240:1-14.
- Darszon, A., T. Nishigaki, C. Beltran, and C.L. Trevino. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*. 91:1305-1355.
- de Lamirande, E. 2007. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost*. 33:60-68.
- Dean, J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays*. 26:29-38.
- Demarco, I.A., F. Espinosa, J. Edwards, J. Sosnik, J.L. De La Vega-Beltran, J.W. Hockensmith, G.S. Kopf, A. Darszon, and P.E. Visconti. 2003. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*. 278:7001-7009.
- Dennis, E.A., J. Cao, Y.H. Hsu, V. Magrioti, and G. Kokotos. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*. 111:6130-6185.

- Dessen, A., J. Tang, H. Schmidt, M. Stahl, J.D. Clark, J. Seehra, and W.S. Somers. 1999. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*. 97:349-360.
- Dong, Z., Y. Liu, K.F. Scott, L. Levin, K. Gaitonde, R.B. Bracken, B. Burke, Q.J. Zhai, J. Wang, L. Oleksowicz, and S. Lu. 2010. Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis*. 31:1948-1955.
- Eerola, L.I., F. Surrel, T.J. Nevalainen, M.H. Gelb, G. Lambeau, and V.J. Laine. 2006. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta*. 1761:745-756.
- Ellerman, D.A., J. Pei, S. Gupta, W.J. Snell, D. Myles, and P. Primakoff. 2009. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular reproduction and development*. 76:1188-1199.
- Escoffier, J., S. Boisseau, C. Serres, C.C. Chen, D. Kim, S. Stambouliau, H.S. Shin, K.P. Campbell, M. De Waard, and C. Arnoult. 2007. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J Cell Physiol*. 212:753-763.
- Escoffier, J., I. Jemel, A. Tanemoto, Y. Taketomi, C. Payre, C. Coatrieux, H. Sato, K. Yamamoto, S. Masuda, K. Pernet-Gallay, V. Pierre, S. Hara, M. Murakami, M. De Waard, G. Lambeau, and C. Arnoult. 2010. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest*. 120:1415-1428.
- Escoffier, J., D. Krapf, F. Navarrete, A. Darszon, and P.E. Visconti. 2012. Flow cytometry analysis reveals a decrease in intracellular sodium during sperm capacitation. *J Cell Sci*. 125:473-485.
- Esposito, G., B.S. Jaiswal, F. Xie, M.A. Krajnc-Franken, T.J. Robben, A.M. Strik, C. Kuil, R.L. Philipsen, M. van Duin, M. Conti, and J.A. Gossen. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2993-2998.
- Evans, J.P. 2012. Sperm-egg interaction. *Annual review of physiology*. 74:477-502.
- Evans, J.P., G.S. Kopf, and R.M. Schultz. 1997. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Developmental biology*. 187:79-93.
- Finaz, C., and S. Hammami-Hamza. 2000. Adhesion proteins expressed on human gamete surfaces and egg activation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 92:235-244.
- Flesch, F.M., J.F. Brouwers, P.F. Nievelstein, A.J. Verkleij, L.M. van Golde, B. Colenbrander, and B.M. Gadella. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci*. 114:3543-3555.
- Flesch, F.M., and B.M. Gadella. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469:197-235.
- Florman, H.M. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca<sup>2+</sup> are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol*. 165:152-164.
- Frohman, M.A., T.C. Sung, and A.J. Morris. 1999. Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1439:175-186.
- Fry, M.R., S.S. Ghosh, J.M. East, and R.C. Franson. 1992. Role of human sperm phospholipase A2 in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A2 activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biol Reprod*. 47:751-759.
- Fujihara, Y., M. Murakami, N. Inoue, Y. Satouh, K. Kaseda, M. Ikawa, and M. Okabe. 2010. Sperm equatorial segment protein 1, SPESP1, is required for fully fertile sperm in mouse. *Journal of cell science*. 123:1531-1536.
- Fujinoki, M., T. Kawamura, T. Toda, H. Ohtake, T. Ishimoda-Takagi, N. Shimizu, S. Yamaoka, and M. Okuno. 2003. Identification of 36-kDa flagellar phosphoproteins associated with hamster sperm motility. *J Biochem*. 133:361-369.



- Fukami, K., K. Nakao, T. Inoue, Y. Kataoka, M. Kurokawa, R.A. Fissore, K. Nakamura, M. Katsuki, K. Mikoshiba, N. Yoshida, and T. Takenawa. 2001. Requirement of phospholipase C $\delta$ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science*. 292:920-923.
- Gadella, B.M. 2008. The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm. *Reprod Domest Anim*. 43 Suppl 5:12-19.
- Gadella, B.M., and J.P. Evans. 2011. Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in experimental medicine and biology*. 713:65-80.
- Gadella, B.M., and R.A. Harrison. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*. 127:2407-2420.
- Gadella, B.M., P.S. Tsai, A. Boerke, and I.A. Brewis. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*. 52:473-480.
- Gahlay, G., L. Gauthier, B. Baibakov, O. Epifano, and J. Dean. 2010. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science*. 329:216-219.
- Galantino-Homer, H.L., P.E. Visconti, and G.S. Kopf. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod*. 56:707-719.
- Gamboa, S., and J. Ramalho-Santos. 2005. SNARE proteins and caveolin-1 in stallion spermatozoa: possible implications for fertility. *Theriogenology*. 64:275-291.
- Garbi, M., S. Rubinstein, Y. Lax, and H. Breitbart. 2000. Activation of protein kinase C $\alpha$  in the lysophosphatidic acid-induced bovine sperm acrosome reaction and phospholipase D1 regulation. *Biol Reprod*. 63:1271-1277.
- Garde, J., and E.R. Roldan. 1996. rab 3-peptide stimulates exocytosis of the ram sperm acrosome via interaction with cyclic AMP and phospholipase A2 metabolites. *FEBS Lett*. 391:263-268.
- Gatti, J.L., S. Castella, F. Dacheux, H. Ecroyd, S. Metayer, V. Thimon, and J.L. Dacheux. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*. 82-83:321-339.
- Ghosh, M., D.E. Tucker, S.A. Burchett, and C.C. Leslie. 2006. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res*. 45:487-510.
- Girard, C.A., B. Seitz-Polski, G. Dolla, A. Augert, D. Vindrieux, D. Bernard, and G. Lambeau. 2014. [New physiopathological roles for the PLA2R1 receptor in cancer and membranous nephropathy]. *Medecine sciences : M/S*. 30:519-525.
- Gong, X.D., G.P. Leung, B.L. Cheuk, and P.Y. Wong. 2000. Interference with the formation of the epididymal microenvironment--a new strategy for male contraception? *Asian J Androl*. 2:39-45.
- Grzmil, P., Y. Kim, R. Shamsadin, J. Neesen, I.M. Adham, U.A. Heinlein, U.J. Schwarzer, and W. Engel. 2001. Human cyritestin genes (CYRN1 and CYRN2) are non-functional. *The Biochemical journal*. 357:551-556.
- Gupta, S.K., and B. Bhandari. 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl*. 13:97-105.
- Gutierrez-Lopez, M.D., S. Ovalle, M. Yanez-Mo, N. Sanchez-Sanchez, E. Rubinstein, N. Olmo, M.A. Lizarbe, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2003. A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated  $\beta$ 1 integrin. *The Journal of biological chemistry*. 278:208-218.
- Hall, J.C., J. Hadley, and T. Doman. 1991. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J Androl*. 12:76-87.
- Hamamah, S., and J.L. Gatti. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod*. 13 Suppl 4:20-30.
- Hammond, S.M., J.M. Jenco, S. Nakashima, K. Cadwallader, Q. Gu, S. Cook, Y. Nozawa, G.D. Prestwich, M.A. Frohman, and A.J. Morris. 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C- $\alpha$ . *J Biol Chem*. 272:3860-3868.

- Harper, C.V., C.L. Barratt, and S.J. Publicover. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. *J Biol Chem*. 279:46315-46325.
- He, Z.Y., C. Brakebusch, R. Fassler, J.A. Kreidberg, P. Primakoff, and D.G. Myles. 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental biology*. 254:226-237.
- He, Z.Y., S. Gupta, D. Myles, and P. Primakoff. 2009. Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. *Molecular reproduction and development*. 76:629-636.
- Hemler, M.E. 2014. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nature reviews. Cancer*. 14:49-60.
- Henderson, W.R., Jr., E.Y. Chi, J.G. Bollinger, Y.T. Tien, X. Ye, L. Castelli, Y.P. Rubtsov, A.G. Singer, G.K. Chiang, T. Nevalainen, A.Y. Rudensky, and M.H. Gelb. 2007. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 204:865-877.
- Hermo, L., K. Barin, and R. Oko. 1994. Developmental expression of immobilin in the rat epididymis. *Anat Rec*. 240:86-103.
- Heytens, E., J. Parrington, K. Coward, C. Young, S. Lambrecht, S.Y. Yoon, R.A. Fissore, R. Hamer, C.M. Deane, M. Ruas, P. Grasa, R. Soleimani, C.A. Cuvelier, J. Gerris, M. Dhont, D. Deforce, L. Leybaert, and P. De Sutter. 2009. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod*. 24:2417-2428.
- Hinton, B.T., and M.A. Palladino. 1995. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc Res Tech*. 30:67-81.
- Ho, H.C., and S.S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122:519-526.
- Ho, H.C., and S.S. Suarez. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod*. 68:1590-1596.
- Hoffer, A.P., and B.T. Hinton. 1984. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biol Reprod*. 30:991-1004.
- Hsu, Y.H., J.E. Burke, D.L. Stephens, R.A. Deems, S. Li, K.M. Asmus, V.L. Woods, Jr., and E.A. Dennis. 2008. Calcium binding rigidifies the C2 domain and the intradomain interaction of GIVA phospholipase A2 as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem*. 283:9820-9827.
- Inoue, N., M. Ikawa, A. Isotani, and M. Okabe. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 434:234-238.
- Inoue, N., Y. Satouh, M. Ikawa, M. Okabe, and R. Yanagimachi. 2011. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:20008-20011.
- Iwamoto, T., A. Tsang, M. Luteran, J. Dickson, E. de Lamirande, M. Okuno, H. Mohri, and C. Gagnon. 1992. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev*. 31:55-62.
- Jaiswal, B.S., and M. Conti. 2003. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10676-10681.
- Jaiswal, B.S., I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, and M. Eisenbach. 1999. Human sperm chemotaxis: is progesterone a chemoattractant? *Biol Reprod*. 60:1314-1319.
- Jegou, A., F. Pincet, E. Perez, J.P. Wolf, A. Ziyat, and C. Gourier. 2008. Mapping mouse gamete interaction forces reveal several oocyte membrane regions with different mechanical and adhesive properties. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 24:1451-1458.
- Jegou, A., A. Ziyat, V. Barraud-Lange, E. Perez, J.P. Wolf, F. Pincet, and C. Gourier. 2011. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:10946-10951.

- Jeng, H., K.M. Liu, and W.C. Chang. 1993. Purification and characterization of reversible sperm motility inhibitors from porcine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 191:435-440.
- Jenkins, C.M., M.J. Wolf, D.J. Mancuso, and R.W. Gross. 2001. Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2 $\beta$ . implications for structure and function. *J Biol Chem.* 276:7129-7135.
- Jiang, J., B.L. Neubauer, J.R. Graff, M. Chedid, J.E. Thomas, N.W. Roehm, S. Zhang, G.J. Eckert, M.O. Koch, J.N. Eble, and L. Cheng. 2002. Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 160:667-671.
- Jin, J., N. Jin, H. Zheng, S. Ro, D. Tafolla, K.M. Sanders, and W. Yan. 2007. Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse. *Biol Reprod.* 77:37-44.
- Jin, J.Y., W.Y. Chen, C.X. Zhou, Z.H. Chen, Y. Yu-Ying, Y. Ni, H.C. Chan, and Q.X. Shi. 2009. Activation of GABAA receptor/Cl<sup>-</sup> channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> are essential. *Syst Biol Reprod Med.* 55:97-108.
- Jin, M., E. Fujiwara, Y. Kakiuchi, M. Okabe, Y. Satouh, S.A. Baba, K. Chiba, and N. Hirohashi. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:4892-4896.
- Jones, P.M., K.M. Turner, J.T. Djordjevic, T.C. Sorrell, L.C. Wright, and A.M. George. 2007. Role of conserved active site residues in catalysis by phospholipase B1 from *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry.* 46:10024-10032.
- Jones, R., D.W. Hamilton, and D.W. Fawcett. 1979. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am J Anat.* 156:373-400.
- Jones, R.C., and R.N. Murdoch. 1996. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of eutherian and marsupial mammals. *Reprod Fertil Dev.* 8:553-568.
- Jungnickel, M.K., H. Marrero, L. Birnbaumer, J.R. Lemos, and H.M. Florman. 2001. Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* 3:499-502.
- Kaji, K., S. Oda, T. Shikano, T. Ohnuki, Y. Uematsu, J. Sakagami, N. Tada, S. Miyazaki, and A. Kudo. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature genetics.* 24:279-282.
- Kalyvas, A., C. Baskakis, V. Magrioti, V. Constantinou-Kokotou, D. Stephens, R. Lopez-Vales, J.Q. Lu, V.W. Yong, E.A. Dennis, G. Kokotos, and S. David. 2009. Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 132:1221-1235.
- Kalyvas, A., and S. David. 2004. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron.* 41:323-335.
- Kennedy, B.P., P. Payette, J. Mudgett, P. Vadas, W. Pruzanski, M. Kwan, C. Tang, D.E. Rancourt, and W.A. Cromlish. 1995. A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem.* 270:22378-22385.
- Kholkute, S.K., J. Rodriguez, and W.R. Dukelow. 1995. In vitro fertilization and the effect of progesterone and 17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone on acrosome reaction of mouse epididymal spermatozoa. *Int J Androl.* 18:146-150.
- Kierszenbaum, A.L. 2000. Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Mol Reprod Dev.* 57:309-310.
- Kim, J.O., B.K. Chakrabarti, A. Guha-Niyogi, M.K. Louder, J.R. Mascola, L. Ganesh, and G.J. Nabel. 2007. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J Virol.* 81:1444-1450.
- Kim, K.S., J.A. Foster, and G.L. Gerton. 2001. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod.* 64:148-156.

- Kini, R.M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 42:827-840.
- Kita, Y., T. Ohto, N. Uozumi, and T. Shimizu. 2006. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta*. 1761:1317-1322.
- Koenig, W., C.Y. Vossen, Z. Mallat, H. Brenner, J. Benessiano, and D. Rothenbacher. 2009. Association between type II secretory phospholipase A2 plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J*. 30:2742-2748.
- Krasznai, Z., Z.T. Krasznai, M. Morisawa, Z.K. Bazsane, Z. Hernadi, Z. Fazekas, L. Tron, K. Goda, and T. Marian. 2006. Role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in calcium homeostasis and human sperm motility regulation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 63:66-76.
- Kudo, I., and M. Murakami. 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:3-58.
- Kuroda, Y., S. Kaneko, Y. Yoshimura, S. Nozawa, and K. Mikoshiba. 1999. Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptors in human sperm? *Life Sci*. 65:135-143.
- Laine, V.J., D.S. Grass, and T.J. Nevalainen. 1999. Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 162:7402-7408.
- Lambeau, G., J. Barhanin, H. Schweitz, J. Qar, and M. Lazdunski. 1989. Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem*. 264:11503-11510.
- Lambeau, G., and M.H. Gelb. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem*. 77:495-520.
- Lambeau, G., and M. Lazdunski. 1999. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci*. 20:162-170.
- Lambeau, G., A. Schmid-Alliana, M. Lazdunski, and J. Barhanin. 1990. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 265:9526-9532.
- Lamour, N.F., and C.E. Chalfant. 2005. Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv*. 5:358-367.
- Le Naour, F., S. Charrin, V. Labas, J.P. Le Caer, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2004. Tetraspanins connect several types of Ig proteins: IgM is a novel component of the tetraspanin web on B-lymphoid cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 53:148-152.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, and C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*. 287:319-321.
- Lee, M.A., J.H. Check, and G.S. Kopf. 1992. A guanine nucleotide-binding regulatory protein in human sperm mediates acrosomal exocytosis induced by the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev*. 31:78-86.
- Lefievre, L., E. De Lamirande, and C. Gagnon. 2000. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl*. 21:929-937.
- Lehr, M. 1996. 3-(3,5-Dimethyl-4-octadecanoylpyrrol-2-yl)propionic acids as inhibitors of 85 kDa cytosolic phospholipase A2. *Arch Pharm (Weinheim)*. 329:483-488.
- Li, K., Y. Ni, Y. He, W.Y. Chen, J.X. Lu, C.Y. Cheng, R.S. Ge, and Q.X. Shi. 2013. Inhibition of sperm capacitation and fertilizing capacity by adjuvin is mediated by chloride and its channels in humans. *Hum Reprod*. 28:47-59.
- Lin, L.L., M. Wartmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth, and R.J. Davis. 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. 72:269-278.
- Lin, Y., and F.W. Kan. 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 55:1133-1146.
- Lin, Y.W., T.H. Hsu, and P.H. Yen. 2013. Mouse sperm acquire a new structure on the apical hook during epididymal maturation. *Asian J Androl*. 15:523-528.
- Lio, Y.C., and E.A. Dennis. 1998. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. 1392:320-332.

- Lio, Y.C., L.J. Reynolds, J. Balsinde, and E.A. Dennis. 1996. Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*. 1302:55-60.
- Lishko, P.V., I.L. Botchkina, and Y. Kirichok. 2011. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*. 471:387-391.
- Llanos, M.N., and M.C. Anabalon. 1996. Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*. 45:313-319.
- Llanos, M.N., P. Morales, and M.S. Rizzo. 1993. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool*. 267:209-216.
- Loewen, C.J., and T.P. Levine. 2005. A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. *J Biol Chem*. 280:14097-14104.
- Lombardo, D., and E.A. Dennis. 1985. Cobra venom phospholipase A2 inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. *J Biol Chem*. 260:7234-7240.
- Lomonte, B., Y. Angulo, M. Sasa, and J.M. Gutierrez. 2009. The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. *Protein Pept Lett*. 16:860-876.
- Lucas, J.A., A.T. Miller, L.O. Atherly, and L.J. Berg. 2003. The role of Tec family kinases in T cell development and function. *Immunol Rev*. 191:119-138.
- Maecker, H.T., S.C. Todd, and S. Levy. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 11:428-442.
- Mannowetz, N., N.M. Naidoo, S.A. Choo, J.F. Smith, and P.V. Lishko. 2013. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife*. 2:e01009.
- Mao, H.T., and W.X. Yang. 2013. Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene*. 526:75-79.
- Marquez, B., and S.S. Suarez. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biol Reprod*. 70:1626-1633.
- Martinez-Garcia, F., J. Regadera, P. Cobo, J. Palacios, R. Paniagua, and M. Nistal. 1995. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia*. 27:195-206.
- Martinez-Lopez, P., C.M. Santi, C.L. Trevino, A.Y. Ocampo-Gutierrez, J.J. Acevedo, A. Alisio, L.B. Salkoff, and A. Darszon. 2009. Mouse sperm K<sup>+</sup> currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 381:204-209.
- Masuda, S., M. Murakami, S. Matsumoto, N. Eguchi, Y. Urade, G. Lambeau, M.H. Gelb, Y. Ishikawa, T. Ishii, and I. Kudo. 2004. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim Biophys Acta*. 1686:61-76.
- McDermott, M., M.J. Wakelam, and A.J. Morris. 2004. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*. 82:225-253.
- Meizel, S., and K.O. Turner. 1983. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett*. 161:315-318.
- Meizel, S., K.O. Turner, and R. Nuccitelli. 1997. Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev Biol*. 182:67-75.
- Menschikowski, M., A. Hagelgans, S. Fuessel, O.A. Mareninova, L. Asatryan, M.P. Wirth, and G. Sievert. 2013. Serum amyloid A, phospholipase A(2)-IIA and C-reactive protein as inflammatory biomarkers for prostate diseases. *Inflamm Res*. 62:1063-1072.
- Menschikowski, M., A. Hagelgans, and G. Sievert. 2006. Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 79:1-33.
- Meyer, A.M., L.D. Dwyer-Nield, G.J. Hurteau, R.L. Keith, E. O'Leary, M. You, J.V. Bonventre, R.A. Nemenoff, and A.M. Malkinson. 2004. Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. *Carcinogenesis*. 25:1517-1524.

- Michaut, M., C.N. Tomes, G. De Blas, R. Yunes, and L.S. Mayorga. 2000. Calcium-triggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:9996-10001.
- Mira, J.P., T. Dubois, J.P. Oudinet, S. Lukowski, F. Russo-Marie, and B. Geny. 1997. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca<sup>2+</sup>-binding site in the mechanism of inhibition. *J Biol Chem*. 272:10474-10482.
- Miranda, P.V., A. Allaire, J. Sosnik, and P.E. Visconti. 2009. Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biol Reprod*. 80:897-904.
- Misao, R., K. Niwa, S. Morishita, J. Fujimoto, Y. Nakanishi, and T. Tamaya. 1997. Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in spermatozoa of infertile men. *Int J Fertil Womens Med*. 42:421-425.
- Mitsuishi, M., S. Masuda, I. Kudo, and M. Murakami. 2006. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem J*. 393:97-106.
- Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe, and E. Mekada. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*. 287:321-324.
- Mortillo, S., and P.M. Wassarman. 1991. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development*. 113:141-149.
- Mortimer, D. 1994. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*. 6:25-31.
- Mosior, M., D.A. Six, and E.A. Dennis. 1998. Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem*. 273:2184-2191.
- Mounier, C.M., P. Luchetta, C. Lecut, R.S. Koduri, G. Faure, G. Lambeau, E. Valentin, A. Singer, F. Ghomashchi, S. Beguin, M.H. Gelb, and C. Bon. 2000. Basic residues of human group IIA phospholipase A2 are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition comparison with other mammalian secreted phospholipases A2. *Eur J Biochem*. 267:4960-4969.
- Mrsny, R.J., J.E. Siiteri, and S. Meizel. 1984. Hamster sperm Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase: increased activity during capacitation in vitro and its relationship to cyclic nucleotides. *Biol Reprod*. 30:573-584.
- Murer, V., J.F. Spetz, U. Hengst, L.M. Altrogge, A. de Agostini, and D. Monard. 2001. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:3029-3033.
- Nakanishi, T., M. Ikawa, S. Yamada, K. Toshimori, and M. Okabe. 2001. Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation. *Dev Biol*. 237:222-231.
- Navarro, B., Y. Kirichok, J.J. Chung, and D.E. Clapham. 2008. Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol*. 52:607-613.
- Newton, L.D., S. Krishnakumar, A.G. Menon, J.P. Kastelic, F.A. van der Hoorn, and J.C. Thundathil. 2010. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. *Mol Reprod Dev*. 77:136-148.
- Nikolopoulou, M., D.A. Soucek, and J.C. Vary. 1985. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*. 815:486-498.
- Nishigaki, T., O. Jose, A.L. Gonzalez-Cota, F. Romero, C.L. Trevino, and A. Darszon. 2014. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and biophysical research communications*. 450:1149-1158.

- Nishimura, H., C. Cho, D.R. Branciforte, D.G. Myles, and P. Primakoff. 2001. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Developmental biology*. 233:204-213.
- Ohnami, N., A. Nakamura, M. Miyado, M. Sato, N. Kawano, K. Yoshida, Y. Harada, Y. Takezawa, S. Kanai, C. Ono, Y. Takahashi, K. Kimura, T. Shida, K. Miyado, and A. Umezawa. 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology open*. 1:640-647.
- Okabe, M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development*. 140:4471-4479.
- Okamura, N., Y. Tajima, A. Soejima, H. Masuda, and Y. Sugita. 1985. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 260:9699-9705.
- Olson, G.E., and M.C. Orgebin-Crist. 1982. Sperm surface changes during epididymal maturation. *Ann N Y Acad Sci*. 383:372-392.
- Oren-Benaroya, R., R. Orvieto, A. Gakamsky, M. Pinchasov, and M. Eisenbach. 2008. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*. 23:2339-2345.
- Oslund, R.C., N. Cermak, C.L. Verlinde, and M.H. Gelb. 2008. Simplified YM-26734 inhibitors of secreted phospholipase A2 group IIA. *Bioorg Med Chem Lett*. 18:5415-5419.
- Pang, S.F., P.H. Chow, and T.M. Wong. 1979. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fertil*. 56:129-132.
- Paria, B.C., K. Elenius, M. Klagsbrun, and S.K. Dey. 1999. Heparin-binding EGF-like growth factor interacts with mouse blastocysts independently of ErbB1: a possible role for heparan sulfate proteoglycans and ErbB4 in blastocyst implantation. *Development*. 126:1997-2005.
- Parks, J.E., and R.H. Hammerstedt. 1985. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod*. 32:653-668.
- Parrington, J., K.T. Jones, A. Lai, and K. Swann. 1999. The soluble sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release from sea-urchin (*Lytechinus pictus*) egg homogenates also triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations after injection into mouse eggs. *Biochem J*. 341 ( Pt 1):1-4.
- Parrington, J., M.L. Jones, R. Tunwell, C. Devader, M. Katan, and K. Swann. 2002. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs. *Reproduction*. 123:31-39.
- Parrington, J., K. Swann, V.I. Shevchenko, A.K. Sesay, and F.A. Lai. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*. 379:364-368.
- Patrat, C., C. Serres, and P. Jouannet. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell*. 92:255-266.
- Peitz, B. 1988. Effects of seminal vesicle fluid components on sperm motility in the house mouse. *J Reprod Fertil*. 83:169-176.
- Peitz, B., and P. Olds-Clarke. 1986. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod*. 35:608-617.
- Pholpramool, C., S. Borwornpinyo, and A. Dinudom. 2011. Role of Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> exchanger 3 in the acidification of the male reproductive tract and male fertility. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 38:403-409.
- Pietrobon, E.O., L. Monclus Mde, A.J. Alberdi, and M.W. Fornes. 2003. Progesterone receptor availability in mouse spermatozoa during epididymal transit and capacitation: ligand blot detection of progesterone-binding protein. *J Androl*. 24:612-620.
- Pietrobon, E.O., M. Soria, L.A. Dominguez, L. Monclus Mde, and M.W. Fornes. 2005. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol Reprod Dev*. 70:58-63.
- Pollanen, P., and T.G. Cooper. 1994. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J Reprod Immunol*. 26:167-216.
- Ponce, R.H., U.A. Urch, and R. Yanagimachi. 1994. Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote*. 2:253-262.

- Poulos, A., J.K. Voglmayr, and I.G. White. 1973. Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. *Biochim Biophys Acta*. 306:194-202.
- Primakoff, P., H. Hyatt, and J. Tredick-Kline. 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*. 104:141-149.
- Primakoff, P., and D.G. Myles. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*. 296:2183-2185.
- Publicover, S., C.V. Harper, and C. Barratt. 2007. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in sperm--making the most of what you've got. *Nat Cell Biol*. 9:235-242.
- Putney, J.W., Jr., L.M. Broad, F.J. Braun, J.P. Lievreumont, and G.S. Bird. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *Journal of cell science*. 114:2223-2229.
- Qi, H., M.M. Moran, B. Navarro, J.A. Chong, G. Krapivinsky, L. Krapivinsky, Y. Kirichok, I.S. Ramsey, T.A. Quill, and D.E. Clapham. 2007. All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:1219-1223.
- Quach, N.D., R.D. Arnold, and B.S. Cummings. 2014. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochemical pharmacology*. 90:338-348.
- Rana, A.P., G.C. Majumder, S. Misra, and A. Ghosh. 1991. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim Biophys Acta*. 1061:185-196.
- Ray, A., and H.B. Treloar. 2012. IgSF8: a developmentally and functionally regulated cell adhesion molecule in olfactory sensory neuron axons and synapses. *Molecular and cellular neurosciences*. 50:238-249.
- Reitinger, S., G.T. Laschober, C. Fehrer, B. Greiderer, and G. Lepperdinger. 2007. Mouse testicular hyaluronidase-like proteins SPAM1 and HYAL5 but not HYALP1 degrade hyaluronan. *Biochem J*. 401:79-85.
- Rejraji, H., B. Sion, G. Prensier, M. Carreras, C. Motta, J.M. Frenoux, E. Vericel, G. Grizard, P. Vernet, and J.R. Drevet. 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod*. 74:1104-1113.
- Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A.C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J.L. Tilly, and D.E. Clapham. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*. 413:603-609.
- Rice, A., J. Parrington, K.T. Jones, and K. Swann. 2000. Mammalian sperm contain a Ca(2+)-sensitive phospholipase C activity that can generate InsP(3) from PIP(2) associated with intracellular organelles. *Developmental biology*. 228:125-135.
- Riffo, M.S., and M. Parraga. 1996. Study of the acrosome reaction and the fertilizing ability of hamster epididymal cauda spermatozoa treated with antibodies against phospholipase A2 and/or lysophosphatidylcholine. *J Exp Zool*. 275:459-468.
- Robaire, B. 2006. The Epididymis. In *Physiology of Reproduction*, J.D. Neill, editor.
- Robaire, B., and R.S. Viger. 1995. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod*. 52:226-236.
- Robert, M., and C. Gagnon. 1996. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod*. 55:813-821.
- Robertson, S.A. 2007. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci*. 85:E36-44.
- Rodeheffer, C., and B.D. Shur. 2004a. Characterization of a novel ZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. *Development*. 131:503-512.
- Rodeheffer, C., and B.D. Shur. 2004b. Sperm from beta1,4-galactosyltransferase I-null mice exhibit precocious capacitation. *Development*. 131:491-501.
- Roldan, E.R., and A.D. Fleming. 1989. Is a Ca<sup>2+</sup> -ATPase involved in Ca<sup>2+</sup> regulation during capacitation and the acrosome reaction of guinea-pig spermatozoa? *J Reprod Fertil*. 85:297-308.



- Roldan, E.R., and C. Fragio. 1993. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the  $\text{Ca}^{2+}$ /ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem*. 268:13962-13970.
- Roldan, E.R., and T. Murase. 1994. Polyphosphoinositide-derived diacylglycerol stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C during exocytosis of the ram sperm acrosome. Effect is not mediated by protein kinase C. *J Biol Chem*. 269:23583-23589.
- Roldan, E.R., T. Murase, and Q.X. Shi. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science*. 266:1578-1581.
- Roldan, E.R., and J.M. Vazquez. 1996. Bicarbonate/ $\text{CO}_2$  induces rapid activation of phospholipase A2 and renders boar spermatozoa capable of undergoing acrosomal exocytosis in response to progesterone. *FEBS Lett*. 396:227-232.
- Rosenson, R.S., and M.H. Gelb. 2009. Secretory phospholipase A2: a multifaceted family of proatherogenic enzymes. *Curr Cardiol Rep*. 11:445-451.
- Rubinstein, E., A. Ziyat, M. Prenant, E. Wrobel, J.P. Wolf, S. Levy, F. Le Naour, and C. Boucheix. 2006a. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental biology*. 290:351-358.
- Rubinstein, E., A. Ziyat, J.P. Wolf, F. Le Naour, and C. Boucheix. 2006b. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Seminars in cell & developmental biology*. 17:254-263.
- Ruoslahti, E., and B. Obrink. 1996. Common principles in cell adhesion. *Experimental cell research*. 227:1-11.
- Sala-Valdes, M., N. Ailane, C. Greco, E. Rubinstein, and C. Boucheix. 2012. Targeting tetraspanins in cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 16:985-997.
- Sanchez, T., and J.J. Moreno. 2001. The effect of high molecular phospholipase A2 inhibitors on 3T6 fibroblast proliferation. *Biochem Pharmacol*. 61:811-816.
- Santi, C.M., P. Martinez-Lopez, J.L. de la Vega-Beltran, A. Butler, A. Alisio, A. Darszon, and L. Salkoff. 2010. The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett*. 584:1041-1046.
- Santi, C.M., G. Orta, L. Salkoff, P.E. Visconti, A. Darszon, and C.L. Trevino. 2013.  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels and transporters in sperm function. *Curr Top Dev Biol*. 102:385-421.
- Sato, H., Y. Taketomi, Y. Isogai, Y. Miki, K. Yamamoto, S. Masuda, T. Hosono, S. Arata, Y. Ishikawa, T. Ishii, T. Kobayashi, H. Nakanishi, K. Ikeda, R. Taguchi, S. Hara, I. Kudo, and M. Murakami. 2010. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest*. 120:1400-1414.
- Sato, H., Y. Taketomi, Y. Isogai, S. Masuda, T. Kobayashi, K. Yamamoto, and M. Murakami. 2009. Group III secreted phospholipase A2 transgenic mice spontaneously develop inflammation. *The Biochemical journal*. 421:17-27.
- Satouh, Y., N. Inoue, M. Ikawa, and M. Okabe. 2012. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of cell science*. 125:4985-4990.
- Saunders, C.M., M.G. Larman, J. Parrington, L.J. Cox, J. Royse, L.M. Blayney, K. Swann, and F.A. Lai. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129:3533-3544.
- Schaloske, R.H., and E.A. Dennis. 2006. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 1761:1246-1259.
- Schroeder, F., J.R. Jefferson, A.B. Kier, J. Knittel, T.J. Scallen, W.G. Wood, and I. Hapala. 1991. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc Soc Exp Biol Med*. 196:235-252.
- Scott, T.W., J.K. Voglmayr, and B.P. Setchell. 1967. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. *Biochem J*. 102:456-461.
- Sedgwick, S.G., and S.J. Smerdon. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*. 24:311-316.

- Seiler, P., T.G. Cooper, and E. Nieschlag. 2000. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. *Int J Androl.* 23:65-76.
- Sengoku, K., N. Takuma, T. Miyamoto, M. Horikawa, and M. Ishikawa. 2004. Integrins are not involved in the process of human sperm-oolemmal fusion. *Human reproduction.* 19:639-644.
- Serre, V., and B. Robaire. 1999. Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content. *Biol Reprod.* 61:705-714.
- Singer, A.G., F. Ghomashchi, C. Le Calvez, J. Bollinger, S. Bezzine, M. Rouault, M. Sadilek, E. Nguyen, M. Lazdunski, G. Lambeau, and M.H. Gelb. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem.* 277:48535-48549.
- Singleton, C.L., and G.J. Killian. 1983. A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. *J Androl.* 4:150-156.
- Six, D.A., and E.A. Dennis. 2003. Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity. *J Biol Chem.* 278:23842-23850.
- Song, H., S. Ramanadham, S. Bao, F.F. Hsu, and J. Turk. 2006. A bromoenol lactone suicide substrate inactivates group VIA phospholipase A2 by generating a diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols. *Biochemistry.* 45:1061-1073.
- Spungin, B., and H. Breitbart. 1996. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 7):1947-1955.
- Stambouliau, S., M.J. Moutin, S. Treves, N. Pochon, D. Grunwald, F. Zorzato, M. De Waard, M. Ronjat, and C. Arnoult. 2005. Juncate, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels. *Dev Biol.* 286:326-337.
- Stein, K.K., J.C. Go, W.S. Lane, P. Primakoff, and D.G. Myles. 2006. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics.* 6:3533-3543.
- Street, I.P., H.K. Lin, F. Laliberte, F. Ghomashchi, Z. Wang, H. Perrier, N.M. Tremblay, Z. Huang, P.K. Weech, and M.H. Gelb. 1993. Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2. *Biochemistry.* 32:5935-5940.
- Strunker, T., N. Goodwin, C. Brenker, N.D. Kashikar, I. Weyand, R. Seifert, and U.B. Kaupp. 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature.* 471:382-386.
- Strunker, T., I. Weyand, W. Bonigk, Q. Van, A. Loogen, J.E. Brown, N. Kashikar, V. Hagen, E. Krause, and U.B. Kaupp. 2006. A K<sup>+</sup>-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm. *Nat Cell Biol.* 8:1149-1154.
- Suarez, S.S., and H.C. Ho. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Domest Anim.* 38:119-124.
- Suarez, S.S., S.M. Varosi, and X. Dai. 1993. Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4660-4664.
- Suckling, K.E. 2009. Phospholipase A2 inhibitors in the treatment of atherosclerosis: a new approach moves forward in the clinic. *Expert Opin Investig Drugs.* 18:1425-1430.
- Sueldo, C.E., S. Oehninger, E. Subias, M. Mahony, N.J. Alexander, L.J. Burkman, and A.A. Acosta. 1993. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertil Steril.* 60:137-140.
- Svensson, C.I., K.K. Lucas, X.Y. Hua, H.C. Powell, E.A. Dennis, and T.L. Yaksh. 2005. Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of the small, secretory phospholipase A2. *Neuroscience.* 133:543-553.
- Tanaka, K., S. Matsutani, A. Kanda, T. Kato, and T. Yoshida. 1994. Thielocin B3, a novel antiinflammatory human group II phospholipase A2 specific inhibitor from ascomycetes. *J Antibiot (Tokyo).* 47:631-638.
- Tardif, S., L. Lefievre, C. Gagnon, and J.L. Bailey. 2004. Implication of cAMP during porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev.* 69:428-435.

- Tarone, G., M.A. Russo, E. Hirsch, T. Odorisio, F. Altruda, L. Silengo, and G. Siracusa. 1993. Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development*. 117:1369-1375.
- Thiery, J.P. 2003. Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Current opinion in genetics & development*. 13:365-371.
- Tomes, C.N., C.R. McMaster, and P.M. Saling. 1996. Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev*. 43:196-204.
- Torres-Flores, V., G. Picazo-Juarez, Y. Hernandez-Rueda, A. Darszon, and M.T. Gonzalez-Martinez. 2011. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod*. 26:2626-2635.
- Toshimori, K., and C. Oura. 1993. Fine structural changes in the postacrosomal region of the hamster and mouse sperm head at the initial stage of gamete interaction in vivo. *Archives of histology and cytology*. 56:109-116.
- Travis, A.J., and G.S. Kopf. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*. 110:731-736.
- Tsai, P.S., K.J. De Vries, M. De Boer-Brouwer, N. Garcia-Gil, R.A. Van Gestel, B. Colenbrander, B.M. Gadella, and T. Van Haften. 2007. Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells. *Mol Membr Biol*. 24:313-324.
- Tulsiani, D.R. 2006. Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol*. 250:58-65.
- Uozumi, N., and T. Shimizu. 2002. Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:59-69.
- Usselman, M.C., R.A. Cone, and D.P. Rossignol. 1985. Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *J Androl*. 6:315-320.
- Valentin, E., and G. Lambeau. 2000. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? *Biochimie*. 82:815-831.
- van Gestel, R.A., I.A. Brewis, P.R. Ashton, J.B. Helms, J.F. Brouwers, and B.M. Gadella. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*. 11:583-590.
- Vernet, P., N. Rigaudiere, N. Ghyselinck, J.P. Dufaure, and J.R. Drevet. 1996. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*. 74:125-131.
- Vernet, P., E. Rock, A. Mazur, Y. Rayssiguier, J.P. Dufaure, and J.R. Drevet. 1999. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol Reprod Dev*. 54:362-370.
- Vijayaraghavan, S., S.A. Goueli, M.P. Davey, and D.W. Carr. 1997. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J Biol Chem*. 272:4747-4752.
- Visconti, P.E., H. Galantino-Homer, G.D. Moore, J.L. Bailey, X. Ning, M. Fornes, and G.S. Kopf. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*. 19:242-248.
- Visconti, P.E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltran, J.J. Acevedo, and A. Darszon. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. 13:395-405.
- Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G.S. Kopf. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. 121:1139-1150.
- Vjugina, U., X. Zhu, E. Oh, N.J. Bracero, and J.P. Evans. 2009. Reduction of mouse egg surface integrin alpha9 subunit (ITGA9) reduces the egg's ability to support sperm-egg binding and fusion. *Biology of reproduction*. 80:833-841.
- Walensky, L.D., and S.H. Snyder. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol*. 130:857-869.

- Wang, D., S.M. King, T.A. Quill, L.K. Doolittle, and D.L. Garbers. 2003. A new sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol.* 5:1117-1122.
- Wassarman, P.M. 1990. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development.* 108:1-17.
- Wassarman, P.M. 2009. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays.* 31:153-158.
- Watanabe, H., T. Takeo, H. Tojo, K. Sakoh, T. Berger, N. Nakagata, T.W. Mak, and G. Kondoh. 2014. Lipocalin 2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. *Development.* 141:2157-2164.
- Weinrauch, Y., C. Abad, N.S. Liang, S.F. Lowry, and J. Weiss. 1998. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J Clin Invest.* 102:633-638.
- Wennemuth, G., A.E. Carlson, A.J. Harper, and D.F. Babcock. 2003. Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup> -channel responses: initial events in sperm activation. *Development.* 130:1317-1326.
- Wertheimer, E.V., A.M. Salicioni, W. Liu, C.L. Trevino, J. Chavez, E.O. Hernandez-Gonzalez, A. Darszon, and P.E. Visconti. 2008. Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 283:35539-35550.
- White, D.R., and R.J. Aitken. 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22:163-177.
- Wilkins, W.P., 3rd, and S.E. Barbour. 2008. Group VI phospholipases A2: homeostatic phospholipases with significant potential as targets for novel therapeutics. *Curr Drug Targets.* 9:683-697.
- Wolfsberg, T.G., and J.M. White. 1996. ADAMs in fertilization and development. *Developmental biology.* 180:389-401.
- Wolkowicz, M.J., L. Digilio, K. Klotz, J. Shetty, C.J. Flickinger, and J.C. Herr. 2008. Equatorial segment protein (ESP) is a human alloantigen involved in sperm-egg binding and fusion. *Journal of andrology.* 29:272-282.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in cell biology.* 19:434-446.
- Yeung, C.H., T.G. Cooper, F. Oberpenning, H. Schulze, and E. Nieschlag. 1993. Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis. *Biol Reprod.* 49:274-280.
- Yokota, Y., K. Hanasaki, T. Ono, H. Nakazato, T. Kobayashi, and H. Arita. 1999. Suppression of murine endotoxic shock by sPLA2 inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA2-independent mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1438:213-222.
- Yoon, S.Y., T. Jellerette, A.M. Salicioni, H.C. Lee, M.S. Yoo, K. Coward, J. Parrington, D. Grow, J.B. Cibelli, P.E. Visconti, J. Mager, and R.A. Fissore. 2008. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest.* 118:3671-3681.
- Yuan, R., P. Primakoff, and D.G. Myles. 1997. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *The Journal of cell biology.* 137:105-112.
- Yuan, W., D.M. Quinn, P.B. Sigler, and M.H. Gelb. 1990. Kinetic and inhibition studies of phospholipase A2 with short-chain substrates and inhibitors. *Biochemistry.* 29:6082-6094.
- Zeng, X.H., C. Yang, S.T. Kim, C.J. Lingle, and X.M. Xia. 2011. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K<sup>+</sup> current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:5879-5884.
- Zeng, Y., E.N. Clark, and H.M. Florman. 1995. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 171:554-563.

- Zeng, Y., J.A. Oberdorf, and H.M. Florman. 1996. pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO<sub>3</sub>(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol.* 173:510-520.
- Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and D.M. Stafforini. 2002. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med.* 30:S294-301.
- Ziyyat, A., E. Rubinstein, F. Monier-Gavelle, V. Barraud, O. Kulski, M. Prenant, C. Boucheix, M. Bomsel, and J.P. Wolf. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of cell science.* 119:416-424.